



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07H 19/04, 21/00, C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/18114 (43) Date de publication internationale: 15 avril 1999 (15.04.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02111</p> <p>(22) Date de dépôt international: 2 octobre 1998 (02.10.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/12379 3 octobre 1997 (03.10.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CIS BIO INTERNATIONAL [FR/FR]; R.N. 306, F-91400 Saclay (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAZIN, Hervé [FR/FR]; Résidence "Les Genêts", Bât. 11, Impasse Laennec, F-30400 Villeneuve lès Avignon (FR). MATHIS, Gérard [FR/FR]; 17, impasse de la Capelle des Ladres, F-30200 Bagnols-sur-Cèze (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>

(54) Title: NOVEL NUCLEOSIDE OR NUCLEOTIDE FLUORESCENT CONJUGATES, PREPARATION METHOD AND USES

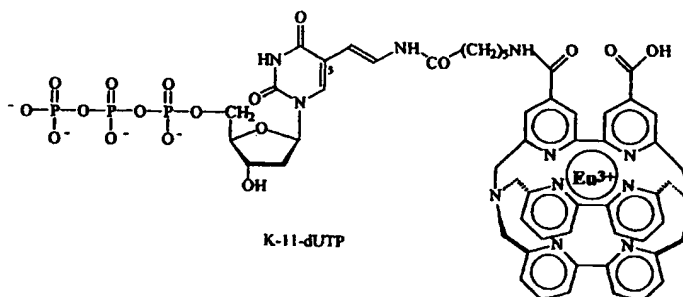
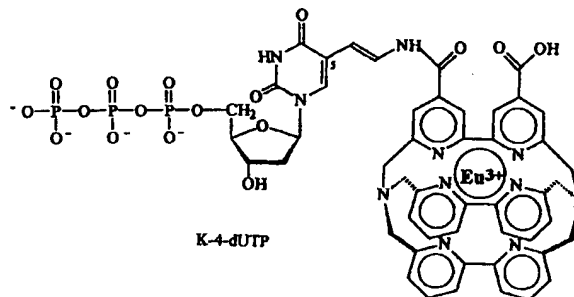
(54) Titre: NOUVEAUX CONJUGUES FLUORESCENTS DE NUCLEOSIDES OU DE NUCLEOTIDES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract

The invention concerns novel nucleoside or nucleotide fluorescent conjugates, useful in particular for detecting, locating and/or isolating nucleic acids or molecules of biological or clinical interest with nucleoside structure or capable of interacting with nucleic acids. The invention also concerns polynucleotides comprising at least a nucleotide fluorescent conjugate.

(57) Abrégé

L'invention concerne de nouveaux conjugués fluorescents de nucléosides ou de nucléotides, utilisables notamment pour détecter, localiser et/ou isoler des acides nucléiques ou des molécules d'intérêt biologique ou clinique à structure nucléosidique ou susceptibles d'interagir avec des acides nucléiques. L'invention concerne également les polynucleotides comprenant au moins un conjugué fluorescent de nucléotide.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Nouveaux conjugués fluorescents de nucléosides ou de nucléotides, leur procédé de préparation et leurs utilisations.

L'invention concerne de nouveaux conjugués fluorescents de nucléosides ou de nucléotides, utilisables notamment pour détecter, localiser et/ou isoler des
5 acides nucléiques ou des molécules d'intérêt biologique ou clinique à structure nucléosidique ou susceptibles d'interagir avec des acides nucléiques.

Dans la suite de la description, les abréviations suivantes seront utilisées :

ARN : acide ribonucléique

ADN : acide désoxyribonucléique

10 A : Adénosine

C : Cytidine

G : Guanosine

T : Thymidine

U : Uridine

15 I : Inosine

suffixe MP : monophosphate

suffixe DP : diphosphate

suffixe TP : triphosphate

préfixe d : désoxy.

20 Une réaction de synthèse enzymatique d'ADN emploie une matrice d'ARN ou d'ADN, une amorce oligonucléotidique de séquence complémentaire à un segment de la matrice, une enzyme appropriée et quatre désoxynucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP (ou dUTP). Diverses enzymes sont connues, comme E. Coli DNA polymérase, T7 DNA polymérase, le fragment de Klenow de la DNA polymérase, la Taq DNA polymérase, une transcriptase inverse, auxquelles on
25 peut ajouter la terminal nucléotidyl transférase qui présente la particularité de ne pas nécessiter de matrice. La synthèse d'ARN se fait de façon similaire sinon que les amorces et matrices requises sont différentes et que des ribonucléotides (ATP, CTP, GTP et UTP) sont utilisés en présence de RNA polymérases.

30 Les nucléotides ou polynucléotides peuvent être marqués radioactivement (^3H , ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S ou ^{125}I).

L'utilisation de molécules marquées présente les inconvénients classiquement associés avec les isotopes radioactifs qui sont les risques liés à la radioactivité ainsi qu'un stockage et une disponibilité limités due à la décroissance
35 radioactive et aux phénomènes de radiolyse.

Le marquage chimique au niveau des nucléotides ou des polynucléotides, permettant d'éviter ces inconvénients, a été décrit dans la littérature. Notamment, on a décrit le marquage par de la biotine de nucléotides dérivés du dUTP ou de l'UTP (Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C., 1981 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6633-37). Ce sont des dérivés dans lesquels la biotine est liée à la position C-5 du noyau pyrimidine par un bras alkylamine. Ces nucléotides marqués sont incorporés in vitro dans des polynucléotides par l'action de polymérases à ADN ou à ARN (EP 0 063 879) et permettent une détection colorimétrique d'acides nucléiques par une réaction de « dot-blot » (Leary J.J., Brigati D.J. and Ward D.D. ; 1983 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4045-49).

D'autres analogues de nucléotides marqués à la biotine basés sur des dérivés de la N-4-aminoalkyl-désoxy-cytidine et de la N-6-aminoalkyl-désoxyadénosine sont décrits dans le brevet US 4,828,979 et dans Gebegehu G.G. *et al.* Nucleic. Acids. Res ; 1987, 15, 4513-4534.

Des dérivés de dUTP, de dATP substitué par de la biotine en position C-8, ainsi que la possibilité de substitution en C-7 d'une 7-déazapurine sont également décrits (EP 0 063 879).

Le dérivé Bio-15-dGTP a également été décrit (Gilliam I.C. and Tener G.M. ; 1989 ; Nucleoside & Nucleotide ; 8, 1453-62). Des dérivés fluorescents tels que la fluorescéine ou la rhodamine peuvent être incorporés dans un acide nucléique par l'intermédiaire d'un nucléoside triphosphate (dATP, dUTP, dCTP) marqué (WO 93 19206). Une discussion sur la position des substitutions sur les purines et pyrimidines ainsi que sur la nature des bras espaceurs utilisables pour le marquage des didésoxynucléotides avec des dérivés de la fluorescéine, bien que dédiée aux terminateurs de chaîne pour le séquençage, donne une vue d'ensemble de la chimie des nucléotides marqués (Confalone P.T., 1990, J. Heterocyclic Chem., 27, 31-46).

L'utilisation conjointe de nucléosides triphosphate marqués à l'aide de traceurs différents (Biotine-11-dUTP, dig-11-dUTP et FITC-11dUTP) permet une visualisation simultanée de séquences différentes lors d'une hybridation (RIED T. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89, 1388-1392).

L'incorporation de désoxynucléotides marqués à la fluorescéine tels que FI-dUTP ou FI-dCTP est également effectuée en ne substituant que partiellement le nucléotide naturel par le composé marqué, dCTP / FIdCTP \approx 2:1 (WO93/19206). Ce même brevet décrit que par un choix de l'enzyme et des conditions expérimentales, il est possible de substituer la totalité d'un nucléotide par un nucléotide marqué.

Les données de la littérature montrent que l'efficacité d'incorporation d'un conjugué de triphosphate est modifiée par le couplage d'une molécule comme la biotine et dans une moindre mesure par la présence du bras permettant le couplage.

Par exemple, dans une réaction de « nick-translation » en présence d'une polymérase à ADN, les taux d'incorporation de divers analogues de triphosphates ont été comparés au nucléoside naturel pris comme référence (100 % d'incorporation) pour un même temps de réaction (90 min) (Gebeyehu G. *et al.* Nucleic Acids Res., 1987, 15, 4525).

Les molécules conjuguées à des triphosphates de nucléosides (Goodchild, J. Bioconjugate chem., 1990, p171 ; Kricka J. Non isotopic Blotting, and Sequencing 1995 Academic Press p47 ; Zhu Z. *et al.* Nucleic Acids Res., 1994, 3418-3422) sont des molécules de taille relativement petites (<800Da), soit neutres soit chargées négativement et de forme essentiellement plane et par conséquent, leur encombrement est réduit mais suffisant pour perturber l'incorporation enzymatique du nucléoside triphosphate.

On a maintenant trouvé de nouveaux conjugués de nucléosides ou de nucléotides comprenant :

- un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou un atome d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique ou encore un atome de carbone du cycle pentofuranose est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur fluorescent, et

- au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

Dans un aspect préféré, lesdits conjugués comprennent :

- un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur fluorescent, et

- au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

Lesdits conjugués peuvent être utilisés dans toutes les applications des nucléosides ou nucléotides marqués sans présenter d'inconvénients majeurs d'utilisation et présentent notamment une capacité élevée à être incorporés dans de l'ADN simple brin ou double brin.

Ces propriétés sont d'autant plus surprenantes que les cryptates de terre rare sont des molécules de masse moléculaire élevée (supérieure à 1400 Da), possédant une structure tridimensionnelle qui présente plus d'encombrement stérique qu'une molécule globalement plane, et ayant un caractère ionique

5 provenant de la présence de l'ion complexé qui leur confère une charge positive.

Du fait de ces caractéristiques structurales, on pouvait s'attendre à ce que les charges positives d'un cryptate de terre rare interagissent fortement avec les charges négatives du groupe triphosphate et modifient sa réactivité ainsi que les qualités de fluorescence du cryptate.

10 Egalement, l'activité des enzymes telles que les polymérases étant sensibles à la présence et à la concentration de certains ions ou agents complexants dans le milieu réactionnel, on pouvait s'attendre à ce que les conjugués selon l'invention entraînent une forte diminution de l'incorporation des nucléotides triphosphates, et donc un faible rendement, notamment lors d'une

15 synthèse de polynucléotides.

De manière surprenante, les résultats obtenus en utilisant les conjugués selon l'invention montrent que, non seulement les cryptates de terre rare n'ont pas d'influence défavorable dans les applications qui font intervenir des réactions enzymatiques, mais conservent leurs propriétés fluorescentes intrinsèques.

20 De manière avantageuse, on a également trouvé que les conjugués selon l'invention présentaient de nouvelles caractéristiques de fluorescence et, en particulier, que la durée de vie d'émission de l'ion de terre rare complexé était significativement augmentée.

Lesdits conjugués peuvent donc être utilisés à titre de marqueurs

25 fluorescents dans toutes les utilisations dans lesquelles on effectue une détection quantitative ou qualitative par mesure de la fluorescence directe ou indirecte.

Dans un aspect préféré, l'invention concerne des conjugués fluorescents de nucléotides comprenant un ribo-nucléotide choisi parmi AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, CMP, CDP, CTP, UMP, UDP, UTP, TMP, TDP, TTP, 2Me AMP, 2Me

30 ADP, 2Me ATP, 1Me GMP, 1Me GDP, 1Me GTP, 5Me CMP, 5Me CDP, 5Me CTP, 5MeO CMP, 5MeO CDP, 5MeO CTP, 7-déaza-ATP, 7-déaza-GTP ou, le cas échéant, un désoxyribo-nucléotide choisi parmi les désoxy- ou didésoxy-ribonucléotides correspondants à ces ribo-nucléotides, et en particulier

- les dérivés de la 2'-désoxy-uridine-5'-triphosphate ou de l'uridine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 5 de la base (principalement squelette aminoallyle ou aminopropyle),

35

- les dérivés de la 2'-désoxy-cytidine-5'-triphosphate ou de la cytidine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 4 ou 5 de la base (principalement squelette aminoallyle ou aminopropyne pour la position 5),
- les dérivés de la 2'-désoxy-adénosine-5'-triphosphate ou de l'adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-guanosine-5'-triphosphate ou de la guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-adénosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base, et
- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-guanosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base.

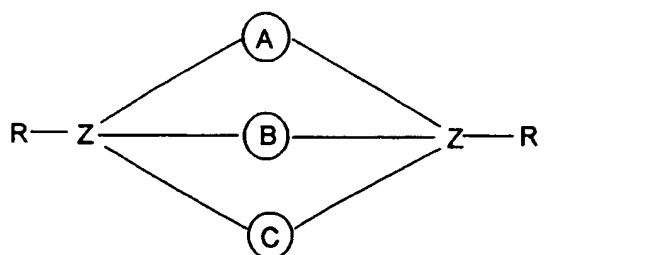
Les nucléotides utilisables aux fins de l'invention comprennent également des nucléotides modifiées chimiquement sur la partie triphosphate, en particulier les dérivés α -thiotriphosphates.

- Selon un autre aspect, l'invention concerne des conjugués fluorescents de nucléosides dans lesquels le ribo- ou désoxyribo-nucléoside est choisi parmi A, G, C, U, T, les désoxy- ou didésoxynucléosides correspondants, et leurs analogues chimiquement modifiés, et en particulier la 3'-azido-3'-désoxythymidine et ses dérivés ; et les analogues 2', 3'-didéoxy de A, T, C, G, U, I.

- Le marqueur fluorescent est constitué par un cryptate de terre rare choisi de préférence parmi les cryptates de terbium, d'euporium, de samarium ou de dysprosium.

- Dans la suite de la description, la notion de « cryptate » ainsi que la nomenclature des macrocycles et polycycles utilisables sont telles que définies par J.M. Lehn dans Struct. Bonding (Berlin), 16, 1, 1973 et dans Acc. Chem. Res. 11, 49 (1978).

Selon un aspect préféré, ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule

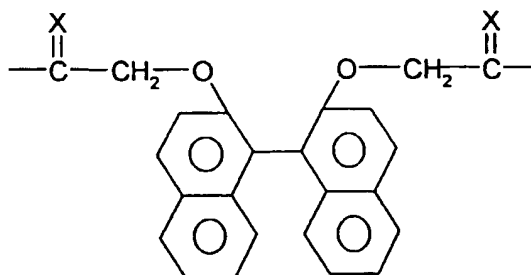
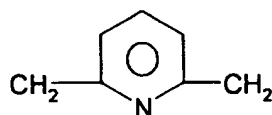
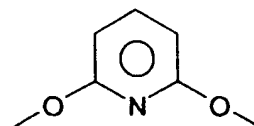
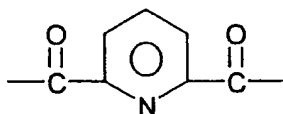


dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

De préférence, il s'agit d'un cryptate de formule (I) ci-dessus dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphthalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :



X₁ et X₂ pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



Dans un aspect avantageux, le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué de l'ion terbium ou europium complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

- (22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;
5 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ;
(22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphénylbipyridine.

- Un marqueur particulièrement avantageux est le cryptate d'euporium Eu
10 tris bipyridine.

De tels composés sont par exemple décrits dans le brevet EP 180 492.

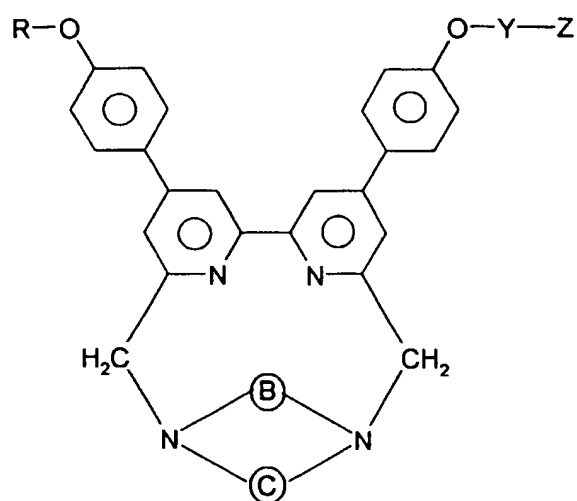
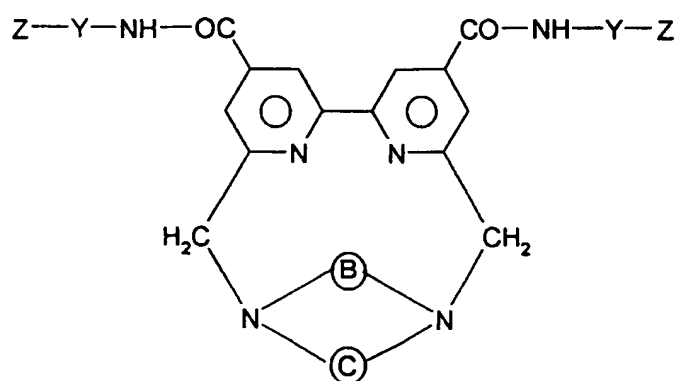
- On peut également utiliser des composés macropolycycliques cryptates complexant des ions de terre rare dans lesquels le motif moléculaire est choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des
15 groupes N-oxydes.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrazines sont décrits dans F. Bodar-Houillon et al., New J. Chem., 1996, 20, 1041-1045.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrimidines sont décrits dans J. M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1992, 75, 1221.

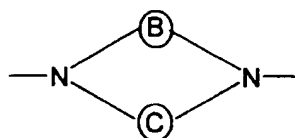
- 20 Des composés macropolycycliques comprenant des hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes sont décrits dans J.M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1991, 74, 572.

- Le cryptate de terre rare utilisé comme marqueur fluorescent peut également être constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé
25 macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :



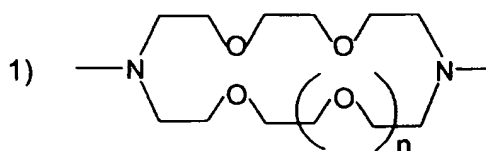
dans lesquels :

- le cycle de formule



5

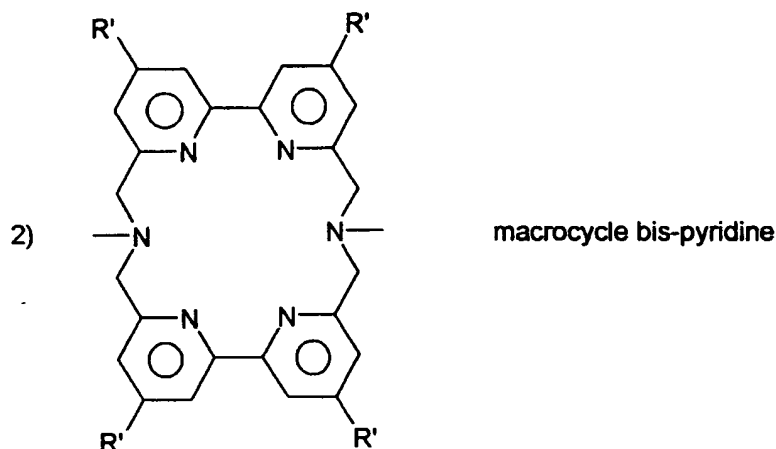
est l'un des cycles suivants :



$n = 0$ ou 1

macrocycle $[N_2O_4]$ ou cycle (22)

macrocycle $[N_2O_3]$ ou cycle (21)



- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁ à C₂₀ contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; parmi les groupes cycloalkylène en C₅ à C₈ ou parmi les groupes arylène en C₆ à C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C₁ à C₁₀ et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

De tels composés sont décrits par exemple dans le brevet EP 321 353.

Au sein des conjugués selon l'invention, ledit marqueur fluorescent peut être lié au ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

Par « liaison directe », on entend la liaison du marqueur fluorescent sur un groupe fonctionnel préalablement introduit ou généré sur un ou plusieurs atomes de la base ou de l'unité pentofuranose du ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide.

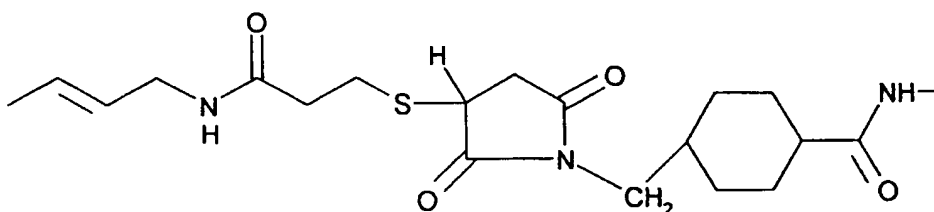
Dans la présente description, on désigne par groupe fonctionnel toute fonction portée par la partie nucléosidique ou nucléotidique ou introduite sur cette partie par toute méthode connue par l'homme du métier et capable de se lier par liaison covalente, directement ou après activation avec une fonction présente sur le

cryptate ou sur le bras espaceur porté par le cryptate. De tels groupes fonctionnels sont notamment les fonctions NH_2 , COOH , CHO , OH ou SH ainsi que les fonctions capables de donner des liaisons covalentes par substitution (halogénures, sulfonates, époxyde) ou par addition (double liaisons type maléïmide). Ces fonctions sont généralement portées par une chaîne hydrocarbonée elle-même
 5 reliée à la partie nucléosidique ou nucléotidique.

Des méthodes d'introduction de ces groupes fonctionnels sont notamment décrites dans C. Kessler, Nonisotopic probing, Blotting and Sequencing, 2nd edition, L.J. Kricka (1995), Ed. Academic press Ltd., Londres, p. 66-72.

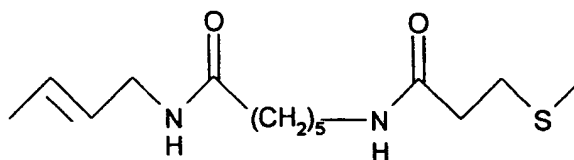
10 Ce bras d'espacement est par exemple constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carboxyle ou
 15 carboxamido ; les groupes cycloalkylène en $\text{C}_5\text{-C}_8$ et les groupes arylène en $\text{C}_6\text{-C}_{14}$, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

En particulier, il peut être choisi parmi les groupes :



20

et



25

Dans un aspect préféré, le conjugué selon l'invention comprend un désoxyribonucléotide qui est la désoxyuridine, un marqueur fluorescent qui est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine et un bras d'espacement qui est un groupe 3-aminoallyle.

L'invention concerne également, selon un aspect ultérieur, un procédé de préparation des conjugués décrits plus hauts.

Ledit procédé de préparation est caractérisé en ce qu'on fait réagir un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou
5 conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou un atome d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique, ou encore un atome de carbone de l'unité pentofuranose est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur
10 fluorescent avec au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare, et qu'on isole le conjugué ainsi obtenu.

Les ribo- ou désoxyribo-nucléosides ou nucléotides ainsi que les marqueurs fluorescents utilisables dans ce procédé de préparation sont tels que décrits plus haut.

Les conjugués selon l'invention qui comprennent un ribo- ou un
15 désoxyribonucléotide sont particulièrement adaptés pour toutes les applications qui nécessitent une mesure qualitative ou quantitative lors de la synthèse ou de l'utilisation de polynucléotides.

Selon un de ses aspects, l'invention concerne également les polynucléotides comprenant au moins un conjugué fluorescent de ribo- ou de
20 désoxyribo-nucléotide tel que décrit plus haut en tant que nucléotide constitutif.

Avantageusement, les polynucléotides obtenus par incorporation de conjugués selon l'invention peuvent comprendre un nombre de conjugués supérieur à 1, et donc un nombre de marqueurs fluorescents supérieur à 1.

En utilisant les conjugués selon l'invention, il est ainsi possible de réaliser
25 le polymarquage de polynucléotides par voie enzymatique. Cette technique permet d'obtenir des polynucléotides marqués plus facilement et en assurant une meilleure reproductibilité qu'en utilisant les techniques classiques de marquage fluorescent par voie chimique. En particulier, elle évite les étapes de séparation nécessaires pour éliminer du milieu les polynucléotides et/ou les marqueurs
30 fluorescents fonctionnalisés n'ayant pas réagi.

On notera que si l'on utilise des cryptates bi-fonctionnalisés, la conjugaison ne se fait que sur un bras, ce qui permet toujours l'incorporation du conjugué dans le cadre d'une synthèse de polynucléotides.

Les conjugués selon l'invention qui comprennent un ribo- ou un
35 désoxyribonucléotide peuvent être utilisés pour la détection et/ou la localisation de composés contenant au moins une séquence d'acide nucléique.

Parmi ces utilisations, on peut citer de manière non limitative :

- la détection et/ou la localisation de séquences spécifiques d'ADN, par exemple en vue de l'établissement de la cartographie de chromosomes ou la détection d'une mutation ;

- 5 - la synthèse de sondes utilisables en recherche biomédicale ou pour l'établissement d'un diagnostic clinique.

On peut également les utiliser dans un procédé de mesure de l'activité enzymatique d'une enzyme impliquée dans une réaction de synthèse d'acide nucléique, par exemple une activité polymérase à ADN ou à ARN, transcriptase
10 inverse, transférase ou ligase, dans laquelle on mesure la fluorescence émise directement ou indirectement par ledit conjugué, ladite émission de fluorescence étant corrélée au taux d'incorporation dudit conjugué dans le polynucléotide d'acide nucléique synthétisé.

Les conjugués selon l'invention peuvent également être utilisés pour
15 mesurer l'activité enzymatique d'une enzyme ayant pour substrat un acide nucléique, par exemple une activité phosphodiesterase, DNase ou Rnase, la fluorescence émise directement ou indirectement par ledit conjugué étant corrélée soit à ladite activité, soit à l'inhibition de ladite activité.

On peut également les utiliser pour mesurer une activité enzymatique
20 modifiant la structure d'un acide nucléique telle qu'une activité hélicase ou intégrase ou une activité modifiant la topologie d'un acide nucléique telle qu'une activité topoisomérase.

Les conjugués selon l'invention peuvent également être utilisés à titre de marqueurs, par exemple pour la préparation d'un composé comprenant un acide
25 nucléique dans lequel est incorporé ledit conjugué en vue d'une détection.

La fluorescence émise par les conjugués selon l'invention peut être soit « directe » : le signal lumineux est émis par le conjugué après excitation à une longueur d'onde donnée, soit « indirecte » : l'émission du signal lumineux est induite
30 par un transfert d'énergie non radiatif entre le conjugué après excitation dit « composé donneur » et une autre molécule fluorescente dite « composé accepteur ».

Dans ce cas particulier, les conditions suivantes sont remplies :

- d'une part, le composé fluorescent accepteur possède un spectre d'absorption qui recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du donneur et présente une absorbance molaire élevée dans cette zone de recouvrement, et
35 un spectre d'émission dans une gamme de longueur d'ondes où le donneur présente une émission intrinsèque faible ;

- d'autre part, l'accepteur et le donneur se situent à proximité l'un de l'autre, l'orientation de leurs dipôles de transition étant approximativement parallèles.

Le principe de la technique de transfert d'énergie non radiatif est décrit notamment dans G. Mathis et al., Clin. Chem., 1993, 39, 1953-1959.

- 5 L'invention est illustrée par les exemples ci-après, dans lesquels certaines concentrations sont données en unité d'absorption (UA) à une longueur d'onde donnée (exprimée en nm) par unité de volume (exprimée en ml) et exprimées par le même chiffre que la densité optique de la solution concernée.

- 10 EXEMPLE 1 : Synthèse de la désoxyuridine marqué au cryptate d'euporium trisbipyridine (conjugué K-11-dUTP).

Dans ce conjugué, le chiffre 11 indique le nombre total d'atomes du bras espaceur et du groupement fonctionnel qui relie la structure cryptate au nucléotide (ici, la liaison se fait en position 5 de la pyrimidine).

- 15 Le nucléoside-triphosphate utilisé est le 5-[N-(6-aminocaproïl)-3-aminoallyl]-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate (AH-dUTP) préparé par réaction du trifluoroacétamido-caproate de N-hydroxysuccinimide (M.S Urdea et al., Nucleic acids Res., 1988, 4937) sur le 5-(3-aminoallyl)-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate préparé suivant un procédé de la littérature (Langer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981), 78, 6633-6637), suivi d'une déprotection ammoniacale (NH₄OH aqueuse 3 %, 45 min à 60°C). Le composé est purifié sur DEAE-Sepharose[®] (Pharmacia) dans un gradient linéaire d'hydrogencarbonate de triéthylammonium (0,1 M à 0,3 M).

1) Méthode A

- 25 On dilue 68 µl d'une solution d'AH-dUTP à 6 µmole/ml (soit 0,4 µmole) à 250 µl d'hydrogencarbonate de triéthylammonium (TEAB) 0,1 M pH 7,8 et on ajoute 320 µl d'une solution de cryptate de N-hydroxysuccinimide (4 mg/ml dans l'acétonitrile) préparée comme suit. Le cryptate d'Euporium [(bis-bpy)-(bpy-diester)] décrit dans l'exemple 4, section A, de la demande EP 0 321 353 est hydrolysé par NaOH et le cryptate diacide obtenu est purifié sur colonne RP-18 HPLC (gradient d'acétonitrile dans de l'acide trifluoroacétique à 1% dans l'eau). Le cryptate d'Euporium [(bis-bpy)-(bpy-diacide)] ainsi obtenu (4mg) est dissout dans 0,5 ml d'acétonitrile anhydre et on ajoute 1mg de N-hydroxysuccinimide, puis une solution de 1,9 mg de dicyclohexylcarbodiimide dissout dans 0,5 ml d'acétonitrile. Après 35 16 h de réaction, le précipité de dicyclohexylurée est filtré et la solution de cryptate de N-hydroxysuccinimide est utilisée directement pour le couplage.

Après 45 min sous agitation, on ajoute 15 µl de TEAB 1M pH 8,5 puis on injecte le mélange sur une colonne Superdex 30[®] HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 0,05M pH 7 contenant 10 % d'acétonitrile (débit 1 ml/min).

On collecte le composé de $R_t \approx 16,4$ mn, puis cette fraction dénommée
5 fraction 1 est concentrée sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 350 µl et contient 8 UA₃₀₄ nm. En estimant un $\epsilon_{304} \approx 35000$, on estime que la concentration en K-dUTP est d'environ 0,72 mM.

Une aliquote (90 µl) de cette fraction 1 est injectée sur la même colonne éluee par un tampon triéthylammonium acétate 25 mM pH 7 contenant 5 %
10 d'acétonitrile. La fraction correspondant au seul pic du chromatogramme est collectée (16 min < R_t < 19 min) et concentrée sous vide (speed-vac). On obtient 150 µl d'une solution de K-dUTP dénommée fraction 2 contenant 1,95 UA₃₀₄ nm.

Le composé est analysé en spectrométrie de masse (électrospray mode positif) :

15 $(M-2H)^+ = 1431$
 $(M-2H+CH_3COOH)^+ = 1491$.

Le spectre UV dans l'eau présente un maximum à 241 nm caractéristique de la partie nucléosidique de la molécule ($\lambda_{max} = 289$ nm, $\epsilon = 7100$, $\lambda_{max} = 240$ nm $\epsilon = 10700$) et un maximum à 304 nm proche du λ_{max} de 305 nm
20 ($\epsilon = 30000$) caractéristique du cryptate d'Europium. On observe un rapport $A_{304}/A_{241} \approx 0,83$ compatible avec la structure proposée.

2) Méthode B

On dissout 0,08 µmol d'une solution d'AH-dUTP dans 80 µl de tampon borate 0,1 M pH 8,6 et on ajoute 90 µl d'une solution de cryptate de
25 N-hydroxysuccinimide (4 mg/ml) préparée comme décrit ci-dessus dans la méthode A.

Après 60 min à 20°C, on ajoute 5 µl de TEAB 1M pH 8,5 et 45 µl d'H₂O. On injecte la totalité du mélange réactionnel sur une colonne Superdex peptide HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 0,05M pH 7 contenant 10 % d'acétonitrile (débit 1 ml/min).

30 On collecte le pic $R_t \approx 16,1$ min qui présente un maximum à 304 nm et un rapport $A_{304}/A_{241} \approx 0,79$. On obtient environ 0,03 µmol de composé K-11-dUTP.

La formule du conjugué K-11-dUTP est donnée en figure 2.

EXEMPLE 2 : Purification du conjugué K-11-dUTP par échange d'ion

35 On utilise une colonne C10/20 (Pharmacia Biotech., Uppsala, S) remplie de DEAE Sépharose[®] Fast Flow (Pharmacia) équilibrée dans un tampon TEAB

10 mM contenant 10 % de méthanol. On dépose une solution de K-11-dUTP contenant également du cryptate d'euporium trisbipyridine fonctionnalisé non conjugué et on élue la colonne (8 ml/min) par 40 ml de tampon A (TEAB 10 mM contenant 10 % de méthanol). On collecte des fractions de 4 ml et on mesure la
 5 fluorescence des fractions éluées ($\lambda_{\text{excitation}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 620 \text{ nm}$). Le cryptate non conjugué est élué dans les fractions 4 et 5, c'est-à-dire peu après le volume mort de la colonne.

On continue l'élution (8 ml/min) par un gradient linéaire de 10 mM TEAB 10 % méthanol (100 ml) à 200 mM TEAB 10 % méthanol (100 ml) et on collecte
 10 des fractions de 5 ml. On observe que la fluorescence (620 nm) est concentrée dans les tubes 43 à 44 ce qui indique que le K-11-dUTP est élué à une concentration $\approx 0,16 \text{ mM TEAB}$. Les fractions contenant le K-11-dUTP sont réunies et concentrées.

15 EXEMPLE 3 : Incorporation du conjugué K-11-dUTP au cours de la copie d'un ADN simple brin par une polymérase (analyse par PAGE et autoradiographie)

L'ADN matrice est obtenu par amplification PCR (de l'anglais
 20 « Polymerase Chain Reaction ») d'un fragment du gène k-ras (exon I) limité par les amorces suivantes :

Amorce k-ras EX1 Sens S 5' d(GGC CTG CTG AAA ATG ACT GAA TAT) 3'

Solution stock à 3 $\text{UA}_{260}/\text{ml}$ soit environ $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Amorce k-ras EX1 Antisens AS 5' d(TGT TGG ATC ATA TTC GTC CAC

25 AAA ATG) 3'

Solution stock à 3 $\text{UA}_{260}/\text{ml}$ soit environ $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

L'amorce AS utilisée ici pour la PCR ci-dessous est biotinylée en son extrémité 5'. Un ADN double-brin biotinylé est synthétisé par PCR en suivant le
 protocole suivant :

30

Milieu PCR 25 μl BUAM (CIS bio international) 10X

8 μl amorce Antisens-bio

8 μl amorce Sens

10 μl taq polymérase (1,25U/ml)

35

10 μl dNTP (quatre dNTP naturels 5mM chaque)

100 μl ADN placenta humain (Sigma) 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

89 μ l eau milli-Q.

Le milieu PCR est réparti en 5 microtubes (5 x 50 μ l), les tubes sont placés dans un thermocycleur et soumis à 31 cycles de PCR suivant le protocole de l'exemple 5.

- 5 L'ADN double brin issu de la PCR (équivalent à 25 pmoles d'amorce biotine) est incubé en présence de 300 μ g de Dynabeads-streptavidine M-280 (Dyna, N).

- Après lavage, l'ADN simple brin (SS ADN) est élué par de la soude 0,1 N puis le surnageant est décanté et neutralisé (HCl dilué), puis concentré jusqu'à un
10 volume résiduel de 60 μ l.

Pour la suite de la manipulation, on utilise une amorce AS (non biotinylée) telle que définie ci-dessus marquée au 32 P décrit dans J. Sambrook et al. Molecular cloning a laboratory manuel, 1989.

On prépare des milieux pour la réaction de copie en utilisant :

- 15 - K-11-dUTP fraction 1 (Rt = 16,4 min) obtenue dans l'exemple 1, diluée à 0,25 mM
- dTTP 0,25 mM
- Mélange de 3 désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP et dGTP) à raison de 0,625 mM chacun
20 - Taq ADN polymérase 1,25 U/ μ l
- Tampon Taq (BUAM) 10X (Cis bio international)
- Amorce AS (3 UA₂₆₀/ml) et amorce AS marquée au 32 P (0,06 UA₂₆₀/ml).

- Parallèlement, on fait une réaction témoin dans laquelle le K-11-dUTP est remplacé par 0,6 μ l de dTTP (0,25 mM) de façon à ce que la concentration en
25 dTTP dans le milieu soit la même que pour les trois autres triphosphates.

30

35

	Volume (μ l)
BUAM 10 X	1
Taq DNA polymérase	0,2
Amorce S 32 P	2
Amorce S	0,35
3 Triphosphate	0,5
K-11-dUTP	0,6
dTTP	0,6
SS ADN	5

On vérifie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) que la réaction en présence de conjugué K-11-dUTP produit une bande correspondant à une copie de l'ADN sur toute sa longueur et présentant une mobilité proche de la
5 bande obtenue pour la réaction témoin ou seuls les quatre nucléotides naturels sont introduits. D'autre part, dans les deux cas, le profil d'électrophorèse ne montre pas d'arrêts de lecture.

La même manipulation a été effectuée en utilisant des rapports dTTP/K-11-dUTP variables, entre autre en utilisant 0,3 μ l de K-11-dUTP et 0,9 μ l
10 de dTTP (dTTP/K-11-dUTP = 3).

La réaction de copie a également été effectuée en présence de DNA polymérase I, fragment de Klenow (37°C, 45 min) et donne sensiblement les mêmes résultats.

Ces résultats montrent que le conjugué dUTP-cryptate d'euporium trisbipyridine est bien incorporé par une polymérase (taq polymérase ou fragment
15 de Klenow) au cours de la copie de l'ADN simple brin.

EXEMPLE 4: Incorporation du conjugué K-11-dUTP au cours de la copie d'un
ADN simple brin par une polymérase (mise en évidence par transfert
20 d'énergie non radiatif et mesure de fluorescence en temps résolu)

On utilise l'ADN simple brin décrit dans l'exemple 3.

On prépare un microtube dans lequel se déroule la réaction de copie (50 μ l), contenant :

- 25
- K-11-dUTP : 0,25 mM fraction 1 (Rt = 16,4 min) obtenu dans l'exemple 1
 - dTTP : 0,25 mM
 - Mélange de 3 désoxynucléotides triphosphates : dATP, dCTP, dGTP à raison de 0,625 mM chacun
 - Amorce AS biotinylée (voir exemple 3) : 3 UA₂₆₀/ml
 - 30
 - Taq DNA polymérase : 1,25 U/ μ l
 - Tampon Taq : BUAM 10X

	Volume (µl)
BUAM 10 X	5
Taq polymérase	1
Amorce biotinylée	1,75
Mix 3 dNTP	2,5
K-11-dUTP	3
dTTP	3
SS ADN	30
eau milli-Q	3,75

5

10

Les tubes sont chauffés 2 min à 90°C (dénaturation) puis incubés à 70°C dans un thermocycleur. Des prélèvements (9 µl) sont effectués à 0, 5, 10, 15 et 20 min. Les aliquotes sont placées dans des tubes contenant 2 µl de solution EDTA 0,5 M pH 8.

15

On obtient l'équivalent de 12,5 pmoles d'amorces biotinylées par 50 µl de réaction, soit 2,5 pmoles pour 10 µl. D'autre part, on a 150 pmoles de K-11-dUTP pour 10 µl.

20

Les prélèvements sont dilués à raison de 8 µl dans 200 µl de tampon L (phosphate 0,1 M pH 7, NaCl 0,15 M, KF 0,4 M et 0,1 % BSA) puis dilués au 1/10 dans le même tampon.

25

On pipette 20 µl (équivalent à $2 \cdot 10^{-14}$ mole de biotine) de prélèvements (dilués comme décrit ci-dessus) dans les puits « essais » d'une microplaque (96-wells flat bottom black low fluorescence microplaque HTRF-96 PACKARD). On ajoute 30 µl de conjugué SA-XL₆₆₅ (conjugué de streptavidine et d'allophycocyanine chimiquement modifiée, CIS bio international) dilué dans le tampon L (concentration finale $2 \cdot 10^{-8}$ M) dans chaque puits « essais » ($6,5 \cdot 10^{-13}$ mole de SA soit 30 équivalent par rapport à la biotine), puis 250 µl de tampon L.

30

On pipette 20 µl de prélèvement dilués dans les puits « blancs » auxquels on ajoute 280 µl de tampon L.

Après incubation (15 mn à 37°C) on lit immédiatement la fluorescence à 620 nm et à 665 nm sur un appareil Discovery (Microplate HTRF - analyser PACKARD).

On calcule les rapports des intensités de fluorescence $Re = E_{665}/E_{620}$ pour chaque essai et $Ro = B_{665}/B_{620}$ pour chaque blanc, puis on calcule la valeur $DF = (Re - Ro)/Ro$ exprimée en pourcentage, les résultats sont reportés dans le tableau 1 ci-dessous.

35

Dans le tableau, comme dans la suite des exemples, les mesures de fluorescence à 620 nm ou à 665 nm sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence qui dépendent de l'appareil utilisé pour la mesure.

5

Tableau 1

temps (min)	E665	E620	Re = E665/E620	B665	B620	Ro = B665/B620	DF
0	1 590	35 770	0,044	1 615	39 423	0,041	8 %
5	3 670	42 016	0,087	1 718	42 961	0,040	118 %
10	4 077	40 448	0,100	1 713	42 234	0,040	149 %
15	4 185	38 670	0,108	1 633	40 089	0,040	166 %
20	5 357	49 403	0,108	1 993	51 777	0,038	182 %

En portant la valeur DF en fonction du temps de réaction, on obtient le profil typique d'une cinétique d'incorporation de nucléotide au cours d'une copie enzymatique (Figure 1).

10

EXEMPLE 5 : Incorporation du conjugué K-11-dUTP au cours d'une réaction de PCR (mise en évidence par transfert d'énergie non radiatif et mesure de fluorescence en temps résolu)

15

1/ PCR :

On amplifie une région de l'exon 1 du gène k-ras limité par les amorces S et AS décrites dans l'exemple 3.

On génère ainsi un produit d'amplification d'une longueur de 117 bp et de séquence (brin sens)

20

5' d(GGC CTG CTG AAA 1ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT 10GGA GCT GGT GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG 20ACG ATA CAG CTA ATT CAG AAT CAT TTT GTG 30 GAC GAA TAT GAT CCA ACA)3'

On choisit une sonde (56 % G + C) dans la partie centrale de la séquence amplifiée (soulignée ci-dessus) une biotine est introduite en son extrémité 5' à l'aide d'un bras N-4-aminohexyl-dC (A. Roget et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 7643-7651) : Sonde CP : biotine-dC GCC TTG ACG ATA CAG C

25

Solution stock à 0,3 UA₂₆₀/ml soit environ $1,7 \cdot 10^{-6}$ M.

On utilise 48 µl de la fraction K-11-dUTP (13 UA₃₀₄/ml) repurifiée dans un tampon TEAAc (voir exemple 1, méthode A) que l'on dilue par 32 µl d'eau milli-Q soit une concentration finale de K-11-dUTP d'environ 0,2 mM.

- On utilise un mélange des 4 désoxynucléotides triphosphates naturels respectivement : dATP 5 mM, dCTP 5 mM, dGTP 5 mM et dTTP 3,5 mM.

On prépare le mélange stock PCR suivant :

- 25 µl Tampon BUAM (CIS bio international) 10X
- 10 µl dNTP
- 8 µl d'amorce S
- 8 µl d'amorce AS
- 10 µl de taq ADN polymérase (soit 12,5 U)
- 9 µl eau milli-Q.

Dans des microtubes pour PCR, on prépare les milieux PCR selon le tableau suivant, en utilisant de l'ADN de placenta humain (Sigma) à 0,01 µg/µl.

	T-	T+	k1-	k1+	k2-	k2+
mélange (µl)	7	7	7	7	7	7
dTTP (µl)	1,5	1,5	0	0	0	0
K-11-dUTP (µl)	0	0	1	1	2	2
DNA (µl)	0	10	0	10	0	10
Eau milli-Q (µl)	16,5	6,5	17	7	16	6
[K-11-dUTP] (µM)	0	0	8	8	16	16
[dTTP] (µM)	200	200	140	140	140	140
[K-11-dUTP]/[dTTP]	-	-	0,06	0,06	0,12	0,12

On effectue la réaction PCR en utilisant le protocole suivant :

1. 5 min / 95°C
- 2.1 1 min / 94°C (dénaturation)
- 2.2 1 min / 60°C (circularisation)
- 2.3 1 min / 70°C (élongation)
- (31 cycles)
- 3.1 8 min / 70°C (élongation finale)

- On contrôle les réactions par électrophorèse sur gel d'agarose. Seuls des tubes contenant de l'ADN (T+, K1+ et K2+) présentent une bande de longueur attendue (par comparaison avec la bande 124 bp du marqueur VIII Boehringer).

2) Mesure du transfert d'énergie en temps résolu :

Le principe de la mesure consiste à hybrider la sonde CP biotinylée sur le fragment d'ADN amplifié, puis de mettre l'hybride en présence du conjugué SA-XL665 (défini dans l'exemple 4). L'incorporation de bases marquées au cryptate d'euporium (donneur) se traduit par un transfert d'énergie non radiatif sur XL665 (accepteur) lorsque le donneur est excité vers 337 nm.

Dans ce cas, l'accepteur émet de la fluorescence à 665 nm avec une durée de vie longue, ce qui permet de différencier ce signal de la fluorescence propre de l'accepteur qui présente une durée de vie courte.

On mesure en temps résolu à la fluorescence à 620 nm et à 665 nm en présence de l'accepteur ("essai" E620 et E665) et en l'absence de l'accepteur ("blanc" B620 et B665), puis on calcule le rapport $Re = E665 / E620$ et $Ro = B665 / B620$. Ensuite on calcule la valeur $DF = (Re - Ro) / Ro$ exprimée en pourcentage une augmentation de valeur DF montre la présence d'un transfert d'énergie et donc l'incorporation du cryptate dans l'ADN amplifié.

On utilise les milieux K1-, K1+, K2- et K2+ provenant des réactions PCR. Dans des microtubes, on dépose 2 µl de chaque milieu PCR auxquels on ajoute 10 µl de sonde CP (0,03 UA260 / ml) et 13 µl de tampon BUAM (2X), on porte les tubes scellés 10 mn à 94°C puis 20 mn à 50°C à l'aide d'un thermocycleur. On dilue 5 µl de milieu d'hybridation dans 200 µl de tampon L et on pipette 40 µl de cette dilution dans les puits "Essais" d'une plaque de microtitration et 40 µl dans les puits "blanc" (96 well flat bottom microplate HTRF, Packard).

On ajoute 40 µl de SA-XL665 à 3.10^{-8} M (CIS bio international) aux puits "Essais" et 200 µl de tampon L. On ajoute 240 µl de tampon L aux puits "Blanc".

On incube 15 mn à 37°C et on effectue immédiatement la mesure de fluorescence sur un appareil Discovery (Packard).

Les résultats sont rapportés dans le tableau 2 ci-après.

Tableau 2

30

tube	E665	E620	Re	B665	B620	Ro	DF
K1-	889	16053	0,0554	847	16825	0,0503	10%
K1+	2406	28392	0,0847	1366	32494	0,0420	102%
K2-	1320	29015	0,0455	1273	31452	0,0405	12%
K2+	3304	36615	0,0902	1491	36278	0,0411	120%

Les résultats montrent que le conjugué K-11-dUTP est incorporé au cours d'une réaction de PCR. De plus, la présence des molécules de cryptate liées à l'ADN amplifié peut être mise en évidence par l'hybridation d'une sonde spécifique de cet ADN amplifié et révélée par un transfert d'énergie non radiatif entre le
5 cryptate et un accepteur lié à la sonde hybridée.

EXEMPLE 6: Synthèse de la désoxyuridine marquée au cryptate d'euporium trisbipyridine (K-4-dUTP).

Dans ce composé, le chiffre 4 indique le nombre total d'atomes du bras
10 qui relie la structure cryptate au nucléotide (ici la liaison se fait en position 5 de la pyrimidine).

Le nucléoside-triphosphate utilisé est le 5-(3-aminoallyl)-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate (AA-dUTP) préparé suivant un procédé de la littérature (Langer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.(1981), 78, 6633-6637). Le composé est purifié sur
15 DEAE-Sepharose[®] (Pharmacia) dans un gradient d'hydrogencarbonate de triéthylammonium (10mM à 300mM).

On dilue 60 µl d'une solution d'AA-dUTP à 5,4 µmole/ ml (soit 0,3 µmole) à 240 µl d'hydrogencarbonate de triéthylammonium (TEAB) 0,1 M pH 7,8 et on ajoute 300 µl d'une solution de cryptate [TBP-(Eu3+)] activé à 4 mg/ml dans
20 l'acétonitrile, soit 0,85 µmol (environ 3 équivalents). Le cryptate [TBP-(Eu3+)] activé est préparé extemporanément comme décrit dans l'exemple 1, méthode A.

Après 35 min sous agitation on ajoute 15 µl de TEAB 1M pH 8,5, on concentre de moitié puis on injecte le mélange sur une colonne Superdex 30[®] HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 25mM pH9 contenant 10%
25 d'acétonitrile (débit 1ml/mln).

On collecte le composé de $R_t \cong 16,3$ mn ; cette fraction dénommée Fraction 1 est concentrée sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 µl puis injectée sur la même colonne éluee par un tampon triéthylammonium acétate 25mM pH7 contenant 5% d'acétonitrile. La fraction correspondant au seul pic du
30 chromatogramme est collectée (16 min $< R_t < 19$ min) et concentrée sous vide (speed-vac) on obtient 260µl d'une solution de K-4-dUTP dénommée Fraction 2 contenant 6,0 UA₃₀₃. En estimant un $\epsilon_{303} \cong 35\ 000$, on estime la concentration en K-4-dUTP à environ 0,65 mM.

Le composé est analysé en spectrométrie de masse (électrospray mode
35 négatif):



Le spectre UV dans l'eau présente un maximum à 243 nm caractéristique du nucléoside ($\lambda_{\text{max}} = 289 \text{ nm } \epsilon = 7100$, $\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm } \epsilon = 10700$) et un maximum à 303 nm proche du λ_{max} de 305 nm ($\epsilon = 27000$) caractéristique du cryptate d'Europium. On observe un rapport $A_{303}/A_{240} \cong 0,82$ compatible avec la structure proposée).

La formule du conjugué K-4-dUTP est donné en figure 2.

EXEMPLE 7: Synthèse de l'uridine marquée au cryptate d'euporium trisbipyridine (K-11-UTP).

Dans ce composé, le chiffre 11 indique le nombre total d'atomes du bras espaceur qui relie la structure cryptate au nucléotide (ici la liaison se fait en position 5 de la pyrimidine).

Le nucléoside-triphosphate utilisé est le 6-aminocaproyl-[5-(3-aminoallyl)-Uridine-5'-triphosphate] (AH-UTP) préparé comme indiqué dans l'exemple 1. Le composé est purifié sur DEAE-Sephadose[®] (Pharmacia) dans un gradient linéaire d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (25mM à 300mM).

On utilise 400 μl d'une solution d'AH-dUTP à 1,1 $\mu\text{mole/ml}$ (soit 0,44 μmole) dans de l'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (TEAB) 0,1 M pH 7,8 et on ajoute 360 μl d'une solution de cryptate [TBP-(Eu³⁺)] activé (3mg/ml dans l'acétonitrile). Le cryptate [TBP-(Eu³⁺)] activé est préparé extemporanément comme décrit dans l'exemple 1, méthode A.

Après 45 min sous agitation on ajoute 40 μl de TEAB 1M pH 8,5 puis on injecte le mélange sur une colonne Superdex peptide 30[®] HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 50 mM pH 7 contenant 10% d'acétonitrile (débit 1ml/mn).

On collecte le composé de $R_t \cong 15,4 \text{ mn}$, cette fraction dénommée Fraction 1 est concentrée sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 μl qui contient $\cong 10 \text{ UA}_{304 \text{ nm}}$. En estimant un $\epsilon_{304} \cong 35 \text{ 000}$, on estime la concentration en K-11-UTP à environ 0,3 mM.

Cette fraction 1 est injectée sur la même colonne éluee par un tampon triéthylammonium acétate 25mM pH7 contenant 5% d'acétonitrile. La fraction correspondant au seul pic du chromatogramme est collectée ($R_t \cong 16,5 \text{ min}$) et concentrée sous vide (speed-vac) on obtient 202 μl d'une solution de K-11-UTP dénommée fraction 2 contenant 7,5 $\text{UA}_{304 \text{ nm}}$.

Le composé est analysé en spectrométrie de masse (électrospray mode négatif):



Le spectre UV dans l'eau présente un maximum à 241 nm caractéristique du nucléoside ($\lambda_{\max} = 289 \text{ nm } \epsilon = 7\,100$, $\lambda_{\max} = 240 \text{ nm } \epsilon = 10\,700$) et un maximum à 303 nm proche du λ_{\max} de 305 nm ($\epsilon = 27\,000$) caractéristique du cryptate d'Europium. On observe un rapport $A_{304}/A_{241} \cong 0,80$ compatible avec la structure proposée).

Le composé est analysé par FPLC (colonne mono-Q, Pharmacia).
Tampon A: Acetate de sodium 20mM pH 5,2 contenant 10% d'acétonitrile. Tampon B: Acetate de sodium 20mM pH 5,0 et LiCl 1M contenant 10% d'acétonitrile. Gradient linéaire de 0 à 30 % B en 25mn. Débit 1ml/mn. Le K-11-UTP présente un $R_t = 10,7 \text{ min}$.

La formule du conjugué K-11-UTP est donnée en Figure 3.

EXEMPLE 8 : Mesures comparées des durées de vie des conjugués dUTP-et UTP-cryptate d'europium trisbipyridine et du cryptate seul

On utilise comme cryptate de référence le cryptate d'Europium [(bis-bpy)(bpy-di(amidoéthylèneamine))] décrit dans l'exemple 4 de la demande EP 0 321 353 (ci-après dénommé KNH_2).

On prépare une solution mère de KNH_2 dans l'eau et on détermine sa concentration par mesure de la densité optique à 306 nm en prenant un $\epsilon_{306} \cong 30\,000$. La solution mère ($6,7 \times 10^{-4} \text{ M}$) est diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH 9; 100 μl de cette dilution intermédiaire sont ensuite dilués dans 600 μl du même tampon. Parallèlement, une solution mère de K-11-dUTP, K-4-dUTP et K-11-UTP (préparés respectivement selon les exemples 1, méthode A ; 6 et 7) dans l'eau, dont la concentration est estimée à $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ par mesure de la densité optique à 304 nm ($\epsilon_{304} \cong 35\,000$). Chaque solution mère est diluée à 50 μl dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,1M pH 7,4 ou dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH 9.

On mesure les valeurs de la durée de vie d'émission de l'Europium (τ en ms) en utilisant un spectrofluorimètre en temps résolu de type LS50 (Perkin-Elmer) et des cuves Helma 5 mm x 5 mm.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3

Composé	Durée de vie τ (ms) dans un tampon Tris 0,1M pH 7,4	Durée de vie τ (ms) dans un tampon Tris 0,1M pH 9
K-11-dUTP	0,587	0,596
K-4-dUTP	0,621	0,651
K-11-UTP	0,636	0,640
KNH ₂ (Référence)	0,368	0,265

5 Ces résultats montrent que le couplage du nucléotide sur la molécule de cryptate entraîne une augmentation de la durée de vie de l'Europium et de nouvelles caractéristiques de fluorescence pour le conjugué cryptate- nucléotide par rapport au cryptate de référence.

10 **EXEMPLE 9 :** Incorporation de K-11-dUTP au cours de l'élongation d'un oligonucléotide par la Terminale Nucléotidyl Transférase (Mise en évidence par transfert d'énergie non radiatif et mesure de fluorescence en temps résolu) :

On prépare un microtube dans lequel se déroule la réaction d'élongation en utilisant :

- 15 - 25 μ l de tampon Tris-acétate 0,2M pH 7,2
 - 4 μ l d'une solution aqueuse de chlorure de cobalt 25 mM
 - 5 μ l d'une solution d'un oligonucléotide (composition A₂C₃G₇T₃ biotinylé en 5'). 2,4 μ M dans H₂O
 - 2 μ l de K-11-dUTP (fraction 2, préparé selon l'exemple 7) à une
 20 concentration de 0,04 mM
 - 8 μ l de dTTP: 0,04 mM
 - 5 μ l d'eau
 - 1 μ l de Terminal Deoxynucleotidyl Transférase (TnT, EC 2.7.7.31) (Sigma , 35 U/ μ l).

25 On prélève 2 μ l de mélange réactionnel qu'on ajoute à 4 μ l d'EDTA 60 mM (pour obtenir un témoin à $t_0 = 0$ min) et on incube le reste à 37°C pour faire une étude cinétique. Après 5, 10, 20, 40, 60 et 80 min de réaction à 37°C, on prélève pour chaque temps 2 μ l de mélange réactionnel qu'on ajoute à 4 μ l d'EDTA 60 mM pour arrêter la réaction. On obtient ainsi les fractions t_5 , t_{10} etc. Ces fractions t_0 , t_5 ,

t_{10} sont diluées par 250 μ l de tampon L (phosphate 0,1M pH 7, NaCl 0,15M, KF 0,4M et 0,1% BSA).

On pipette 50 μ l (équivalent à $2,3 \cdot 10^{-12}$ mole de biotine) de prélèvements dilués comme décrit ci-dessus dans les puits "essais" (dénommés E_0 , E_5 , E_{10} etc.) d'une microplaque (96-wells flat bottom black low fluorescence microplaque HTRF-96 PACKARD). On ajoute 50 μ l de conjugué SA-XL₆₆₅ (CIS bio international) dilué dans le tampon L ($1,5 \cdot 10^{-8}$ M), dans chaque puit "essais", puis 150 μ l de tampon L.

On réalise un "blanc" à partir d'un mélange réactionnel décrit ci-dessus dans lequel l'enzyme n'a pas été ajoutée mais remplacé par 1 μ l d'eau, on prélève 2 μ l de ce mélange et on lui fait subir les traitements et dilutions décrits ci-dessus. On pipette 50 μ l de ce prélèvement dilué dans les puits dénommés "blancs" auxquels on ajoute 50 μ l de conjugué SA-XL₆₆₅ et 150 μ l de tampon L.

Après incubation (15 min à 37°C), on lit la fluorescence à 620 nm et à 665 nm sur un appareil DISCOVERY (Microplate HTRF-analyser PACKARD).

On calcule les rapports des intensités de fluorescence $Re = E_{665}/E_{620}$ pour chaque essai et $Ro = B_{665}/B_{620}$ pour chaque blanc, puis on calcule la valeur $DF = (Re - Ro)/Ro$ exprimée en pourcentage, les résultats sont reportés dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

Temps min)	0	5	10	20	40	60	80
F665	602	1585	2186	3610	5347	8204	5542
F620	9559	10757	9921	11023	10754	10589	8971
$Re = F_{665}/F_{620}$	0,063	0,147	0,22	0,327	0,497	0,77	0,618
DF	0	129	242	409	673	1104	865

Le blanc présente un rapport $B_{665}/B_{620} = 0,064$. Pour t_0 on observe un rapport $E_{665} / E_{620} = 0,063$, le transfert étant de $DF = 100 \times (Re - R_0)/R_0 = 100 (0,063 - 0,064) / 0,064$ soit un transfert pratiquement nul. En calculant ainsi le DF pour chaque temps, on observe que le transfert d'énergie exprimé par la valeur DF augmente au cours du temps, ce qui montre que le K-11-dUTP est incorporé dans la chaîne oligonucléotidique par la terminal nucleotidyl transferase.

EXEMPLE 10: Propriétés photophysiques d'un oligonucléotide dans lequel sont incorporés des molécules de cryptate :

On effectue une réaction d'incorporation de K-11-dUTP par la TnT suivant l'exemple 9 en multipliant toutes les quantités par 3. On vérifie que l'incorporation de K-11-dUTP suit la même cinétique en réalisant la mesure de DF en fonction du temps. Après 80mn de réaction, on l'arrête par 12 µl de solution d'EDTA 400 mM.

- 5 On prélève 105 µl de mélange réactionnel et on le dépose sur une colonne NAP5 (Pharmacia) équilibrée dans du tampon phosphate 10 mM pH 7,4.

L'oligonucléotide est élué par 600 µl de tampon. Cette fraction appelée « fraction 1 » (volume d'exclusion) est analysée comme suit : dans les puits d'une microplaque on dépose 50 µl de fraction 1 auquel on ajoute 200 µl de tampon L ce qui constitue le « blanc cryptate ». Dans les puits suivants on dépose 50 µl de fraction 1 et 50 µl de conjugué SA-XL₆₆₅ (CIS bio international) (1,5. 10⁻⁸ dans du tampon L) et 150 µl de tampon L ce qui constitue le puit « essai ». On mesure la fluorescence à 620 nm et à 665 nm sur un appareil DISCOVERY (Microplate HTRF-analyser PACKARD).

15

	F665	F620
Blanc K	2343	67481
Essai	42982	37722

On calcule $DF = 100 \times (Re - R_0) / R_0 = 100 (1,14 - 0,0347) / 0,0347 = 3180\%$, cette fraction contient donc l'oligonucléotide marqué au cryptate.

- On observe que les fractions obtenues en continuant l'élution (fractions 2, 3 ...) présentent une valeur de DF faible par rapport à celle de F1 et une fluorescence brute élevée à 620 nm : elles contiennent donc l'excès de K-11-dUTP non incorporé.

En comparant la fluorescence obtenue dans la fraction F1 (qui correspond aux molécules de cryptate incorporées dans la chaîne oligonucléotidique) avec la fluorescence de solutions étalon contenant du cryptate à une concentration connue, on peut estimer que la fraction F1 contient environ $5 \cdot 10^{-11}$ mol de cryptate, étant donné que la quantité d'oligonucléotide estimée dans la fraction F1 est de $2 \cdot 10^{-11} / 2 \cdot 10^{-11} = 2,5$ de nucléotide marqué au cryptate par chaîne oligonucléotidique.

- Il faut noter que l'incorporation de K-dUTP et de dTTP se fait de façon simultanée et de façon statistique.

Sur l'extrémité 3' de chaque chaîne oligonucléotidique sont donc incorporés un nombre variable de nucléotides T et en moyenne, au moins 2 nucléotides K-dU.

La durée de vie τ est calculée à partir de la pente à la droite obtenue en traçant $\text{Log } E_{620} = f(t)$.

On mesure la durée de vie de l'émission à 620nm pour l'oligonucléotide marqué contenu dans la fraction 1 (tampon phosphate 10 mM pH 7,4) en utilisant un fluorimètre en temps résolu KRYPTOR (CIS bio international) avec une excitation à 337 nm. On obtient une durée de vie $\tau = 866 \mu\text{s}$. Cette durée de vie est supérieure à la durée de vie du conjugué K-11-dUTP ($\tau = 681 \mu\text{s}$) mesuré simultanément dans les mêmes conditions.

On observe donc une augmentation de la durée de vie du cryptate incorporé dans une chaîne oligonucléotidique.

EXEMPLE 11: Synthèse de l'adénosine marquée au cryptate d'Europium trisbipyridine (conjugué K-9-ATP).

Dans ce composé, le chiffre 9 indique le nombre total d'atomes du bras espaceur qui relie la structure cryptate au nucléotide (ici la liaison se fait en position 8 de la purine).

Le nucléoside-triphosphate utilisé est le [8-(6-aminohexyl)-Adenosine-5'-triphosphate] (AH-ATP, Sigma). On utilise une solution de 0,1 μmol AH-ATP dans 100 μl d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (TEAB) 0,1 M pH 8 et on ajoute 100 μl d'une solution de cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (4 mg/ml dans l'acétonitrile). Le cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (NHS/DCC dans l'acétonitrile) est préparé extemporanément comme décrit dans l'exemple 1, méthode A.

Après 35 min sous agitation on ajoute 5 μl de TEAB 1M, on concentre de moitié puis on injecte le mélange sur une colonne Superdex 30[®] HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 50 mM pH 8 contenant 10% d'acétonitrile (débit 1ml/min).

On collecte le composé de $R_t \approx 16,7$ min, cette fraction dénommée Fraction 1 est concentrée sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 μl puis est injectée sur la même colonne éluee par un tampon triéthylammonium acétate 25mM pH7 contenant 5% d'acétonitrile. La fraction correspondant au seul pic du chromatogramme est collectée ($R_t = 17,2$ min) et concentrée sous vide (speed-vac).

Le spectre UV dans l'eau présente un maximum à 245 nm, un maximum à 283 nm proche de la λ_{max} caractéristique du nucléoside ($\lambda_{\text{max}} = 279$, $\epsilon = 21\ 000$)

et un maximum à 303 nm proche de la λ_{max} de 305 nm ($\epsilon = 27\ 000$) caractéristique du cryptate d'Europium. On observe un rapport $A_{305}/A_{280} \cong 1$ compatible avec la structure proposée.

La formule du conjugué K-9-ATP est donnée en Figure 3.

5

EXEMPLE 12 : Incorporation d'un conjugué UTP-cryptate d'euporium trisbipyridine (K-11-UTP) au cours d'une réaction de transcription in-vitro (mise en évidence par transfert d'énergie non radiatif et mesure de fluorescence en temps résolu)

10

On utilise l'incorporation simultanée de K-11-UTP et de Bio-14-CTP (conjugué CTP-Biotine) sur une même molécule d'ARN par transcription in-vitro.

1/ Transcription

15

La réaction de transcription d'un ADN double brin renfermant un promoteur (ADN plasmidique pSTP18 et pSTP19 contenant le promoteur T7 et linéarisé par *Eco* R1) en ARN est faite à l'aide d'un kit de transcription SP6/T7 (Boehringer-Mannheim). Le transcrit obtenu possède une longueur de 1035 bases.

Le milieu de transcription contient en plus des ribonucleotides à une concentration finale de 0,5mM, 0,2% de K-11-UTP et 30% de bio-14-CTP qui seront incorporés statistiquement au long de la chaîne.

20

On utilise le K-11-UTP fraction 2 décrit dans l'exemple 7 qui est dilué dans l'eau de façon à obtenir une concentration de 20 μM .

La solution de bio-14-CTP est préparée par dilution dans l'eau d'une solution commerciale 10 mM de Biotine-14-CTP (Gibco-BRL/Life Technologies).

25

Le milieu de transcription est préparé dans des microtubes pour PCR (0,5ml) suivant le tableau ci-dessous :

	Volume	Concentration finale	RNTPmarqué / rNTPmarqué+rNTPnaturel
Tampon de transcription (10X)	2µl		
ADN plasmide (T7) (0,5µg /µl)	2µl		
ATP (5 mM)	2µl	0,5 mM	
GTP (5 mM)	2µl	0,5 mM	
UTP (5 mM)	2µl	0,5 mM	
K-11-UTP (20µM)	2µl	2 µM	0,4 %
CTP (3,5 mM)	2µl	0,35 mM	
Bio-14-CTP (1,5 mM)	2µl	0,15 mM	30 %
Inhibiteur de RNase (20 U /µl)	1µl		
H ₂ O	1µl		
T7 RNA polymerase	2µl		
Volume total	20µl		

Après ajout de l'enzyme, on prélève 2 µl de milieu réactionnel qui sont immédiatement dilués par 38 µl d'une solution EDTA 50 mM pH 8, cette solution est ensuite diluée en prélevant 19 µl qui sont dilués par 114 µl de tampon L. Cette solution servira à constituer un témoin de bruit de fond à $t_0 = 0$ min.

Le mélange réactionnel est placé à 37°C dans un thermocycleur. Après des temps de réaction déterminés (60 min, 90 min et 120 min), on prélève 2 µl de mélange réactionnel qui sont dilués comme précédemment par 38 µl d'EDTA 50 mM pH 8. Ces solutions sont ensuite diluées en prélevant 19 µl qui sont dilués par 114 µl de tampon L.

On dépose 50 µl de chaque solution diluée correspondant aux temps 0 min, 60 min, 90 min et 120 min dans les puits d'une microplaque noire (96 well flat bottom microplate HTRF, Packard).

On ajoute 50µl d'une solution de SA-XL665 (CIS bio international) à une concentration de $6,25 \cdot 10^{-7}$ M dans du tampon L. On ajoute ensuite 100 µl de tampon L.

2/ Mesure du transfert d'énergie en temps résolu

Après incubation (15 min à température ambiante) on effectue une mesure de fluorescence à 620 nm et à 665 nm sur un appareil DISCOVERY (Packard).

Pour chaque temps de réaction considéré, on évalue le transfert d'énergie en calculant le rapport $Re = F665/F620$. Le rapport $Ro = F665/F620$ pour le temps t_0 permet d'évaluer le niveau du bruit de fond, la même mesure faite sur une dilution de 2 μ l d'un mélange réactionnel de transcription dans lequel l'enzyme a été remplacé par un volume équivalent d'eau donne le même niveau de bruit de fond.

Le transfert d'énergie est calculé par la formule $DF = (Re-Ro)/Ro$ pour chaque temps. Les résultats sont reportés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5

10

Temps (mn)	F665	F620	$Re = F665/F620$	$DF = (Re-Ro)/Ro$ (%)
0	2108	14672	0,143	0
60	6329	18755	0,337	135
90	6672	17026	0,392	174
120	7386	18179	0,406	184

On observe que la valeur DF augmente, traduisant une augmentation du transfert d'énergie provenant de l'incorporation du K-11-UTP et du bio-CTP dans l'ARN transcrit.

15 La réaction de transcription décrite ci-dessus est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose (3%),

On observe une bande de taille élevée montrant l'intégrité du fragment d'ARN produit, cette bande est caractérisée par une migration identique à la bande produite à partir d'une transcription faite à partir des rNTP naturels seuls.

20 La courbe des valeurs de DF en fonction du temps de réaction donnée en figure 4 montre le profil typique d'une cinétique d'incorporation de nucléotide au cours d'une transcription enzymatique. Ces résultats montrent que le conjugué K-11-UTP est incorporé efficacement par une RNA polymérase.

25 **EXEMPLE 13** : Incorporation d'un conjugué K-11-dUTP au cours d'une réaction de transcription in-vitro (mise en évidence par transfert d'énergie non radiatif et mesure de fluorescence en temps résolu après hybridation d'une sonde-accepteur) :

La réaction de transcription d'un ADN double brin en ARN est faite à l'aide d'un kit de transcription (Gibco BRL). L'ADN double brin renfermant le promoteur T7 est lui-même obtenu par une PCR réalisée avec un couple d'amorces dont une des amorces contient la séquence du promoteur de la T7 RNA polymérase (EC 2.7.7.6).

Le transcrit obtenu possède une longueur théorique de 115 bases.

Le principe général de la transcription par une RNA polymérase est décrit p. 5.58 et 5.59 de « Molecular Cloning, A Laboratory Manual » 2nd édition, J. Sambrook, E.F. Fritsch et T. Maniatis CSH Press 1989.

On peut également utiliser une autre RNA polymérase tel que SP6 ou T3 RNA polymérase : dans ce cas, la séquence de l'amorce PCR concernée sera modifiée pour incorporer le promoteur spécifique de la RNA polymérase considérée.

L'incorporation d'un promoteur est décrit dans le § 13.5 et § 23.2 dans « PCR : Clinical Diagnostics and Research » A ; Rolfs et al. Springer-Verlag (1992) ainsi que dans D.Y. Kwoth et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86, 1173-1177.

1/ Obtention de l'ADN double brin renfermant le promoteur de la RNA polymerase :

On utilise un protocole analogue à celui décrit dans l'exemple 5, mais en utilisant uniquement des désoxynucléotides afin de générer un produit PCR primaire de 117 bp.

On effectue une deuxième PCR (PCR secondaire) en utilisant comme ADN cible (DNA) 2 µl d'une dilution au 1/100^{ème} du produit de la PCR primaire. Pour cette PCR secondaire, on remplace l'amorce k-ras EX1 Antisens par l'amorce suivante nommée T7-AS de séquence

5' d(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG TGG ATC ATA TTC GTC CAC AAA ATG) 3'.

La partie de cette séquence écrite en italique correspond à la séquence du promoteur de la T7 RNA polymerase.

L'amorce k-ras EX1 Sens possède la séquence suivante :

5' d(CTG.CTG.AAA.ATG.ACT.GAA.TAT) 3'.

A l'issu de cette PCR secondaire, on obtient un ADN double brin d'une longueur théorique de 132 pb et de séquence suivante (brin sens) :

5' d(CTG.CTG.AAA.ATG.ACT.GAA.TAT.AAA.CTT.GTG.GTA.GTT.GGA.GCT.GGT.GGC.GTA.GGC.AAG.AGT.GCC.TTG.ACG.ATA.CAG.CTA.ATT.CAG.AAT.CAT.TTT.GTG.GAC.GAA.TAT.GAT.CCA.CCC.CTA.TAG.TGA.GTC.GTA.TTA) 3'.

La partie en italique représente la séquence T7 (brin sens) et la partie soulignée représente la séquence correspondant à la sonde lors de l'étape d'hybridation.

- 5 La transcription va produire la séquence ARN suivante (séquence homologue au brin antisens du fragment d'ADN transcrit) dans laquelle la partie soulignée correspond à la séquence qui est reconnue par la sonde biotinylée :

5' pppG.UGG.AUC.AUA.UUC.GUC.CAC.AAA.AUG.AUU.CUG.AAU.UAG.
CUG.UAU.CGU.CAA.GGC.ACU.CUU.GCC.UAC.GCC.ACC.AGC.UCC.AAC.UAC.CA
C.AAG.UUU.AUA.UUC.AGU.CAU.UUU.CAG.CAG.GCC 3'.

- 10 La sonde RAS12N utilisée est biotinylée en 5' et possède la séquence suivante :

Biotine-5' d(GTT.GGA.GCT.GGT.GGC.GTA.GG) 3'.

2/ Transcription :

- 15 Le milieu de transcription contient, en plus des ribonucléotides naturels à une concentration finale de 0,5 mM, 2 % de K-11-UTP qui sera incorporé statistiquement au long de la chaîne d'ARN.

On utilise le K-11-UTP fraction 2 décrit dans l'exemple 7 qui est dilué dans l'eau de façon à obtenir une concentration de 100 µM.

- 20 Le milieu de transcription est préparé dans des microtubes pour PCR (0,5 ml) suivant le tableau ci-dessous :

	Volume	Concentration finale	K-11-UTP / (K-11-UTP+UTP)
Tampon de transcription (5X)	10µl		
ADN PCR positive (T7) (0,5µg /µl)	25µl		
DTT 0,1M	2µl		
Mix rNTPs (5 mM chaque)	5µl	0,5 mM	
K-11-UTP (100µM)	5µl	10 µM	2 %
Inhibiteur de RNase (20 U /µl)	2µl		
H ₂ O	0,5µl		
T7 RNA polymerase (50 U /µl)	0,5µl		
Volume total	50µl		

Le mélange réactionnel est placé dans un thermocycleur à 40°C pendant 120 min, puis on arrête la réaction par 4 µl d'EDTA 0,2 M pH 8.

Dans un microtube pour PCR, on prélève 2 µl du milieu réactionnel et on le dilue par 10 µl de sonde RAS12N (0,03 UA₂₆₀/ml dans H₂O) puis on ajoute
5 13 µl de tampon d'hybridation (tampon phosphate 100 mM pH 7,4 / BSA 0,1 % NaCl 1M). On porte 10 min à 70°C puis on hybride 20 min à 45°C dans un thermocycleur.

5,5 µl du milieu d'hybridation ci-dessus sont dilués dans du tampon L (qsp 200 µl) pour donner le milieu d'hybridation dilué HT_{pos}.

10 On constitue un blanc en effectuant une transcription selon le protocole ci-dessus mais en remplaçant l'ADN de PCR positive par un volume équivalent de milieu PCR provenant d'une réaction de PCR négative qui ne contient pas l'ADN cible.

Le milieu de transcription négative (2 µl) est arrêté, puis on effectue une
15 hybridation comme décrit ci-dessus et on dilue dans du tampon L. On obtient ainsi le milieu d'hybridation dilué HT_{neg}.

3/ Mesure du transfert d'énergie en temps résolu

L'incorporation du cryptate dans la chaîne d'ARN est mise en évidence
20 par l'hybridation d'une sonde complémentaire à la séquence d'ARN, cette sonde étant marquée avec un conjugué SA-XL665 (CIS bio international) par l'intermédiaire du couple streptavidine-biotine.

Dans les puits d'une microplaque noire (96 well flat bottom microplate HTRF, Packard), on dépose 50 µl de milieu HT_{pos} et 50 µl de conjugué SA-XL665
25 (CIS bio international) dilué à $1,5 \cdot 10^{-10}$ M dans du tampon L puis on ajoute 100 µl de tampon L. Ces puits vont permettre la mesure du transfert d'énergie par le calcul de $Re = E665/E620$ détaillé dans l'exemple 5.

Dans les puits voisins, on dépose 50 µl de milieu HT_{neg}, on ajoute 50 µl de conjugué SA-XL665 et 100 µl de tampon L comme décrit ci-dessus. Ces puits
30 constituent une référence pour évaluer le bruit de fond par le calcul de Ro.

On effectue une mesure de fluorescence à 620 nm et à 665 nm sur un appareil DISCOVERY (Packard).

Le transfert d'énergie est calculé par la formule suivante $DF = (Re - Ro)/Ro$ pour chaque temps, les résultats sont reportés dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6

Milieu	E665	E620	Re = E665/E620	DF (%)
HT _{neg}	738	17900	0,041	
HT _{neg}	1714	15010	0,114	178

On observe un transfert de 178 % dans le cas où la transcription est faite
5 en présence de l'ADN cible.

REVENDICATIONS

1. Conjugué fluorescent de nucléoside ou de nucléotide, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou un atome d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique, ou encore un atome de carbone de l'unité pentofuranose est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur fluorescent, et
- 10 - au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

2. Conjugué fluorescent de nucléoside ou de nucléotide, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 15 - un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur fluorescent, et
- au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

- 20 3. Conjugué selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un conjugué fluorescent de nucléotide comprenant un ribo-nucléotide choisi parmi AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, CMP, CDP, CTP, UMP, UDP, UTP, TMP, TDP, TTP, 2Me AMP, 2Me ADP, 2Me ATP, 1Me GMP, 1Me GDP, 1Me GTP, 5Me CMP, 5Me CDP, 5Me CTP, 5MeO CMP, 5MeO CDP, 5MeO CTP, 7-déaza-ATP, 7-
- 25 déaza-GTP ou un désoxyribo-nucléotide choisi parmi les désoxy- ou didésoxy-ribonucléotides correspondant à ceux-ci.

4. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le ribo- ou désoxyribo-nucléotide est choisi parmi :

- 30 - les dérivés de la 2'-désoxy-uridine-5'-triphosphate ou de l'uridine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 5 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-cytidine-5'-triphosphate ou de la cytidine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 4 ou 5 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-adénosine-5'-triphosphate ou de l'adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- 35 - les dérivés de la 2'-désoxy-guanosine-5'-triphosphate ou de la guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,

- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-adénosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base, et

- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-guanosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base.

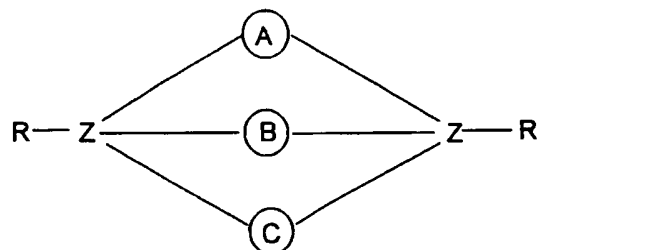
- 5 5. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un conjugué fluorescent de nucléoside dans lequel le ribo- ou désoxyribo-nucléoside est choisi parmi A, G, C, U, T, les désoxy- ou didésoxynucléosides correspondants, leurs analogues chimiquement modifiés.

- 10 6. Conjugué selon la revendication 5, caractérisé en ce que le désoxyribonucléoside est choisi parmi la 3'-azido-3'-désoxythymidine et ses dérivés ; et les analogues 2', 3'-didésoxy de A, T, C, G, U, I.

7. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est lié à un groupe fonctionnel introduit ou généré sur la base ou sur l'unité pentofuranose du ribo- ou désoxyribo- nucléoside
15 ou nucléotide, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

8. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terbium, d'euporium, de samarium ou de dysprosium.

- 20 9. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule



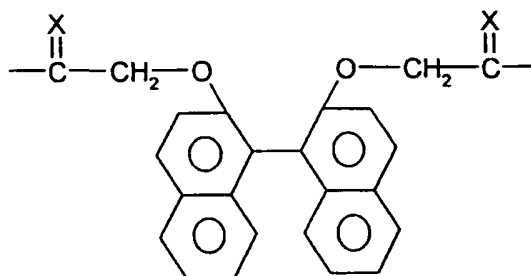
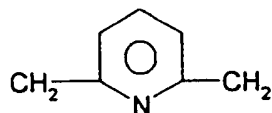
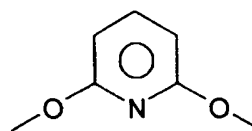
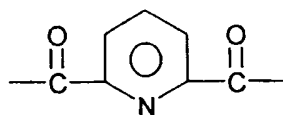
- 25 dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocyclé, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus
30 au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif

moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

10. Conjugué selon la revendication 9, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare de formule (I) dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphthalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :



- 10 X_1 et X_2 pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



X étant l'oxygène ou l'hydrogène.

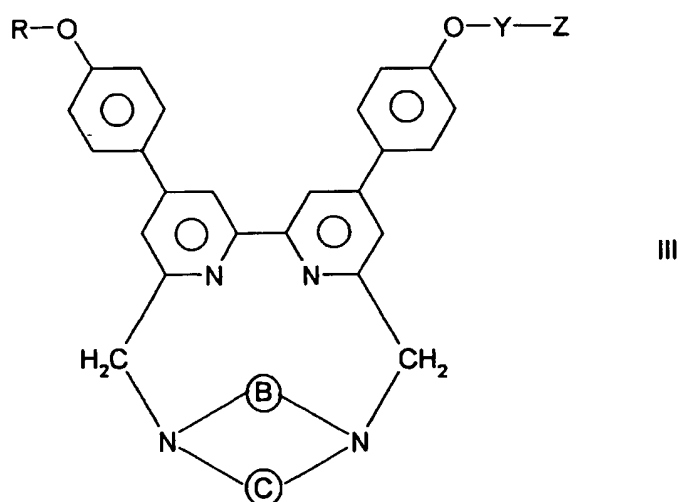
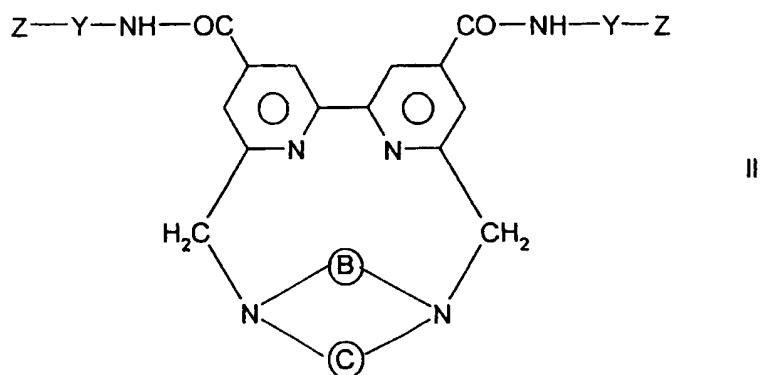
- 15 11. Conjugué selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué de l'ion terbium ou europium complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

- 20 (22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ; (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ; (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphénylbipyridine.

12. Conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est le cryptate d'euprium Eu trisbipyridine.

13. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique comprenant un motif moléculaire choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupements N-oxydes.

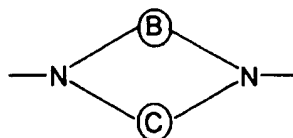
14. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :



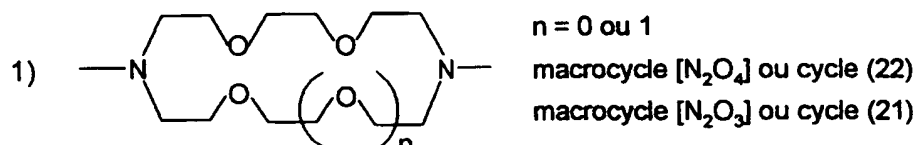
dans lesquels :

15

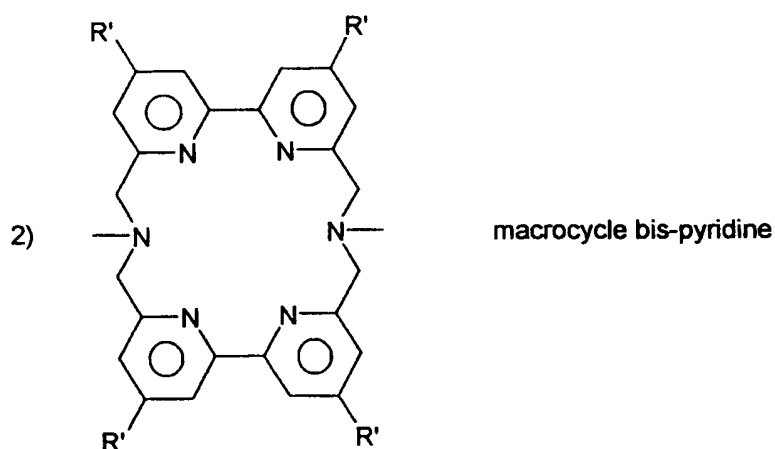
- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :



5



- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 à C_{20} contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou éventuellement contenant par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; parmi les groupes cycloalkylène en C_5 à C_8 ou parmi les groupes arylène en C_6 à C_{14} , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

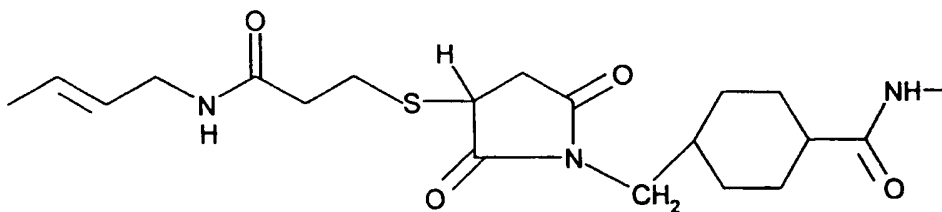
- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C_1 à C_{10} et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

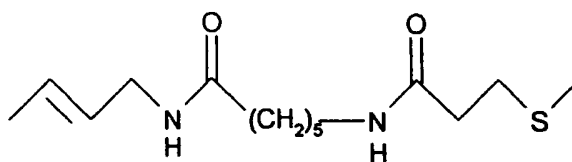
15. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est lié au ribo- ou au désoxyribo-nucléoside ou nucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁-C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C₅-C₈ et les groupes arylène en C₆-C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

16. Conjugué selon la revendication 15, caractérisé en ce que le bras d'espacement est choisi parmi les groupes :



15

et



17. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que le désoxyribonucléotide est la désoxyuridine, le marqueur fluorescent est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine et le bras d'espacement est un groupe 3-aminoallyle.

18. Procédé de préparation des conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'on fait réagir un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou un atome d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique ou encore un atome de carbone de l'unité pentafuronose est susceptible d'être impliqué dans une

liaison avec un marqueur fluorescent avec au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

19. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 à titre de marqueurs.

5 20. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 6 à 16 en tant que nucléotide constitutif dans une réaction de synthèse d'acide nucléique.

10 21. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 7 à 16 pour la détection et/ou la localisation de composés contenant au moins une séquence d'acide nucléique.

15 22. Utilisation selon la revendication 20 dans un procédé de mesure de l'activité enzymatique d'une enzyme impliquée dans une réaction de synthèse d'acide nucléique, caractérisée en ce que l'on mesure la fluorescence émise directement ou indirectement par ledit conjugué, ladite émission de fluorescence étant corrélée au taux d'incorporation dudit conjugué dans le polynucléotide d'acide nucléique synthétisé.

23. Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que l'activité enzymatique est une activité polymérase à ADN ou à ARN, transcriptase inverse, transférase ou ligase.

20 24. Utilisation selon la revendication 20 dans un procédé de mesure de l'activité enzymatique ayant pour substrat un acide nucléique.

25. Polynucléotide comprenant au moins un conjugué selon l'une des revendications 1 à 3 et 6 à 16.

1/4

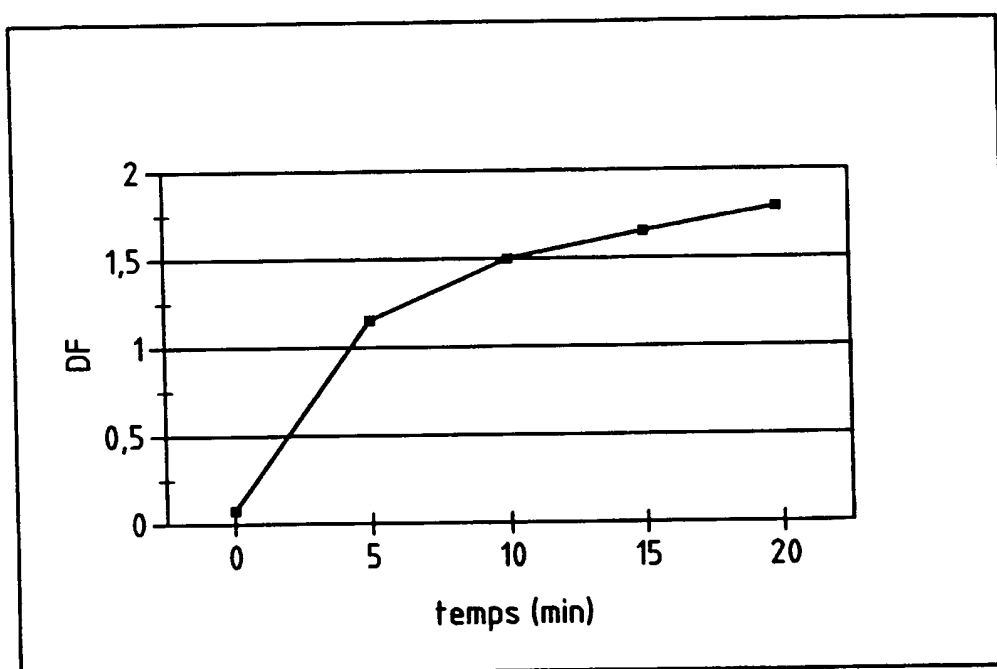


FIG.1

2/4

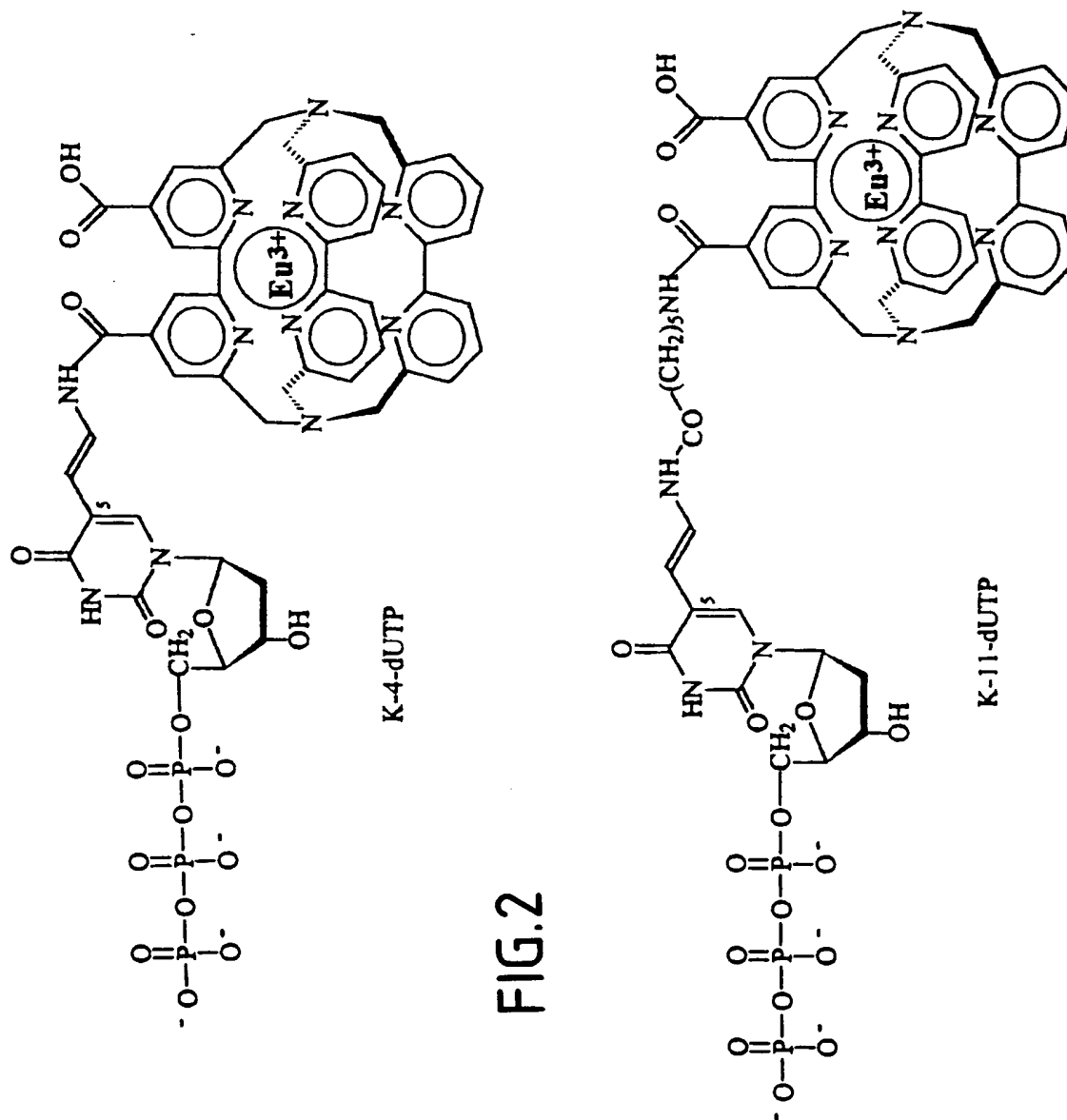
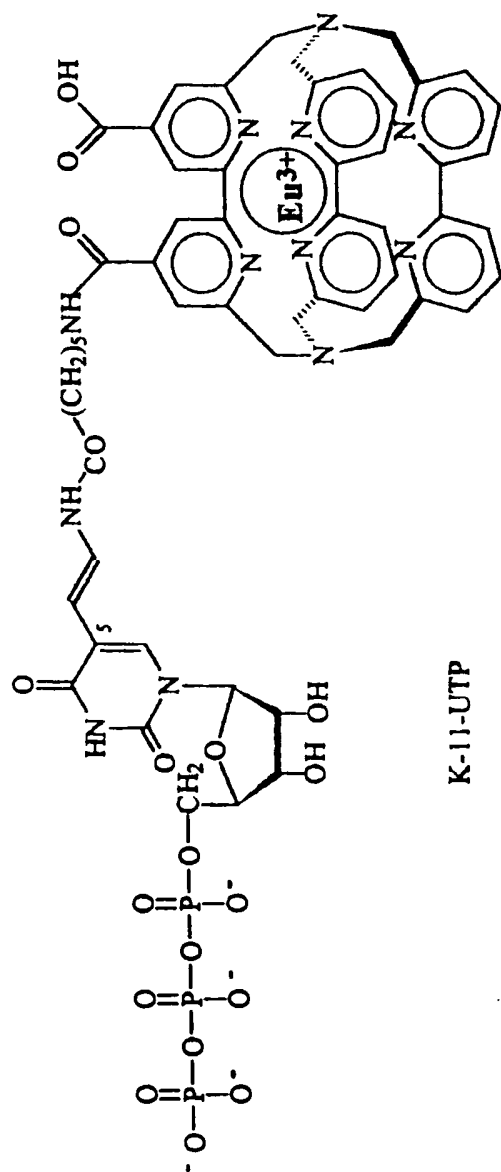


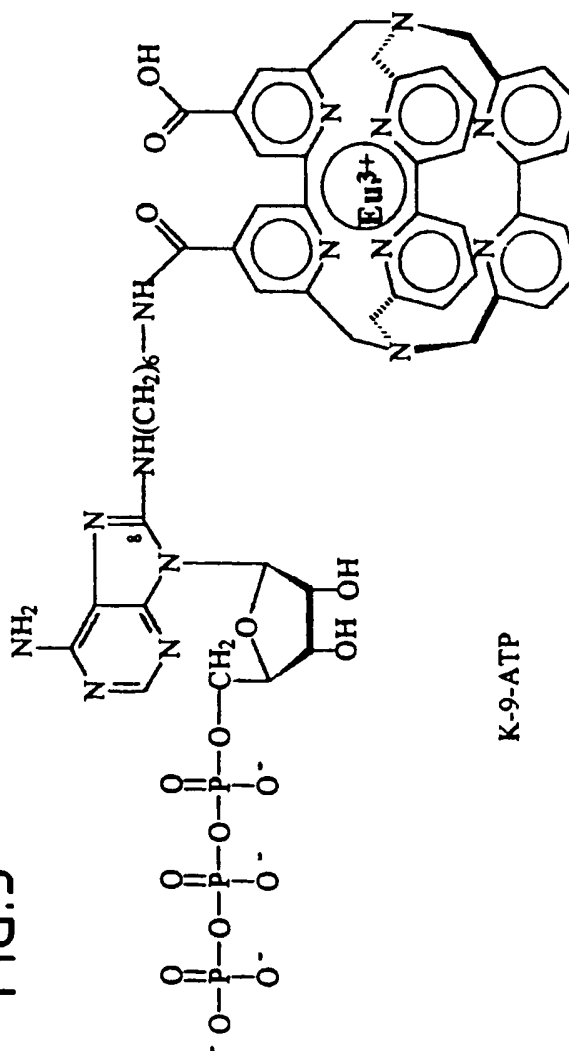
FIG.2

3/4



K-11-UTP

FIG.3



K-9-ATP

4/4

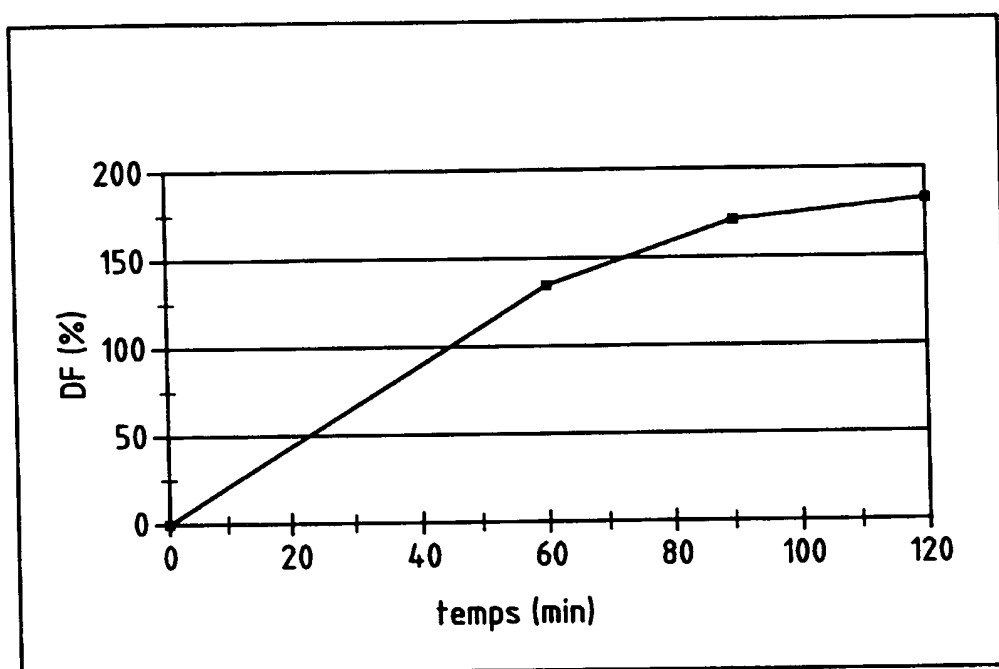


FIG.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H19/04 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 321 353 A (ORIS SA) 21 June 1989 see the whole document ----	1-25
Y	WO 92 13264 A (CIS BIO INT) 6 August 1992 see example 1 ----	1-25
Y	EP 0 180 492 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 7 May 1986 see claims 13,14 ----	1-25
Y	WO 92 01225 A (CIS BIO INT) 23 January 1992 see claims 1-15 ----	1-25
Y	WO 92 14841 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 3 September 1992 see claims 1-10; figures 1-3 -----	1-25



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 1999

Date of mailing of the international search report

21/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 341 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0321353 A	21-06-1989	FR 2624862 A	23-06-1989
		AU 2908889 A	19-07-1989
		CA 1334026 A	17-01-1995
		DE 3871353 A	25-06-1992
		ES 2043874 T	01-01-1994
		FI 92698 B	15-09-1994
		WO 8905813 A	29-06-1989
		JP 3502575 T	13-06-1991
		RU 2074859 C	10-03-1997
		US 5457185 A	10-10-1995
		US 5534622 A	09-07-1996
		US 5162508 A	10-11-1992
		US 5346996 A	13-09-1994
WO 9213264 A	06-08-1992	FR 2672128 A	31-07-1992
		AT 112055 T	15-10-1994
		AU 1274292 A	27-08-1992
		DE 69200445 D	27-10-1994
		DE 69200445 T	16-02-1995
		DK 569496 T	06-03-1995
		EP 0569496 A	18-11-1993
		ES 2066602 T	01-03-1995
		JP 6508919 T	06-10-1994
		US 5527684 A	18-06-1996
EP 0180492 A	07-05-1986	FR 2570703 A	28-03-1986
		CA 1329593 A	17-05-1994
		CA 1339200 A	05-08-1997
		DE 3587380 D	08-07-1993
		DE 3587380 T	05-01-1994
		JP 1997833 C	08-12-1995
		JP 6199858 A	19-07-1994
		JP 7014935 B	22-02-1995
		JP 1997834 C	08-12-1995
		JP 6184151 A	05-07-1994
		JP 7015471 B	22-02-1995
		JP 1925883 C	25-04-1995
		JP 6055741 B	27-07-1994
		JP 61087680 A	06-05-1986
		US 5220012 A	15-06-1993
		US 4927923 A	22-05-1990
		US 5432101 A	11-07-1995
WO 9201225 A	23-01-1992	FR 2664699 A	17-01-1992
		AT 130096 T	15-11-1995
		AU 8198091 A	04-02-1992
		DE 69114499 D	14-12-1995
		DE 69114499 T	28-03-1996
		DK 539477 T	11-12-1995
		EP 0539477 A	05-05-1993
		ES 2082217 T	16-03-1996
		GR 3018429 T	31-03-1996
		JP 6500852 T	27-01-1994
		US 5512493 A	30-04-1996
WO 9214841 A	03-09-1992	AT 156522 T	15-08-1997
		AU 653012 B	15-09-1994
		AU 1450792 A	15-09-1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Jonal Application No

PCT/FR 98/02111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9214841 A		CA 2079448 A	15-08-1992
		DE 69221404 D	11-09-1997
		DE 69221404 T	05-02-1998
		EP 0525181 A	03-02-1993
		ES 2108109 T	16-12-1997
		JP 5505201 T	05-08-1993
		JP 6057717 B	03-08-1994
<hr/>			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. internationale No

PCT/FR 98/02111

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07H19/04 C07H21/00 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07H C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 321 353 A (ORIS SA) 21 juin 1989 voir le document en entier ----	1-25
Y	WO 92 13264 A (CIS BIO INT) 6 août 1992 voir exemple 1 ----	1-25
Y	EP 0 180 492 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 7 mai 1986 voir revendications 13,14 ----	1-25
Y	WO 92 01225 A (CIS BIO INT) 23 janvier 1992 voir revendications 1-15 ----	1-25
Y	WO 92 14841 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 3 septembre 1992 voir revendications 1-10; figures 1-3 -----	1-25

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/01/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scott, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den .e Internationale No

PCT/FR 98/02111

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0321353 A	21-06-1989	FR 2624862 A	23-06-1989
		AU 2908889 A	19-07-1989
		CA 1334026 A	17-01-1995
		DE 3871353 A	25-06-1992
		ES 2043874 T	01-01-1994
		FI 92698 B	15-09-1994
		WO 8905813 A	29-06-1989
		JP 3502575 T	13-06-1991
		RU 2074859 C	10-03-1997
		US 5457185 A	10-10-1995
		US 5534622 A	09-07-1996
		US 5162508 A	10-11-1992
		US 5346996 A	13-09-1994
WO 9213264 A	06-08-1992	FR 2672128 A	31-07-1992
		AT 112055 T	15-10-1994
		AU 1274292 A	27-08-1992
		DE 69200445 D	27-10-1994
		DE 69200445 T	16-02-1995
		DK 569496 T	06-03-1995
		EP 0569496 A	18-11-1993
		ES 2066602 T	01-03-1995
		JP 6508919 T	06-10-1994
		US 5527684 A	18-06-1996
EP 0180492 A	07-05-1986	FR 2570703 A	28-03-1986
		CA 1329593 A	17-05-1994
		CA 1339200 A	05-08-1997
		DE 3587380 D	08-07-1993
		DE 3587380 T	05-01-1994
		JP 1997833 C	08-12-1995
		JP 6199858 A	19-07-1994
		JP 7014935 B	22-02-1995
		JP 1997834 C	08-12-1995
		JP 6184151 A	05-07-1994
		JP 7015471 B	22-02-1995
		JP 1925883 C	25-04-1995
		JP 6055741 B	27-07-1994
		JP 61087680 A	06-05-1986
		US 5220012 A	15-06-1993
		US 4927923 A	22-05-1990
		US 5432101 A	11-07-1995
WO 9201225 A	23-01-1992	FR 2664699 A	17-01-1992
		AT 130096 T	15-11-1995
		AU 8198091 A	04-02-1992
		DE 69114499 D	14-12-1995
		DE 69114499 T	28-03-1996
		DK 539477 T	11-12-1995
		EP 0539477 A	05-05-1993
		ES 2082217 T	16-03-1996
		GR 3018429 T	31-03-1996
		JP 6500852 T	27-01-1994
		US 5512493 A	30-04-1996
WO 9214841 A	03-09-1992	AT 156522 T	15-08-1997
		AU 653012 B	15-09-1994
		AU 1450792 A	15-09-1992

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. e Internationale No

PCT/FR 98/02111

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9214841 A		CA 2079448 A	15-08-1992
		DE 69221404 D	11-09-1997
		DE 69221404 T	05-02-1998
		EP 0525181 A	03-02-1993
		ES 2108109 T	16-12-1997
		JP 5505201 T	05-08-1993
		JP 6057717 B	03-08-1994
<hr/>			